الجمهورية العربية السورية

جامعــة دمشــق

كليــة الزراعــة

قسم وقاية النبات

تقصي النيماتودا الممرضة للحشرات في ريف دمشق واختبار قدرتها الإمراضية على بعض العوائل الحشرية

دراسة أعدت لنيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية

/وقاية النبات/

إعداد

المهندسة أماني أديب جاويش

المشرف المشارك

الدكتور عبد النبي بشير

أستاذ – قسم وقاية النبات

المشرف العلمي

الدكتور خالد العسس

أستاذ مساعد – قسم وقاية النبات

2010–2009

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ﴾

[البقرة، 32]

صدق الله العظيم

الإهداء

إلى الحبيب المفقود

والدي تغمده الله برحمته

إلى الحبيبة والأخت والصديقة والأم، من بدعائها ورضاها وفقني الله إلى إنجاز هذا العمل

والدتي أمـــــد اللـــــه عمرها

كما أهدي نتاج عملي لرفيق دربي وسندي بعد الله، داعيةً المولى بأن يبقيه ذخراً لي

زوجـــي الغالـــــي

وإلى حبات الندى التي تتلألأ عند الشروق، والورود التي تزين حديقة عمري، مع تمنيــاتي بأن يصلوا لأفضل وأحسن مما وصلت إليه.

أولادي سعيد وهديل وإسراء

أمـــانــــي

شكر وتقدير

بداية، أحمد الله العلي القدير الذي أعانني على إكمال هذا العمل بفضله وكرمه وجزيل عطائه.

ومن ثم أتوجه بجزيل الشكر والامتنان إلى كل الذين أناروا لي الطريق وأفادوني بعلمهم وخلاصة تجاربهم في إنجاز هذا البحث.

وأخص بالذكر أساتذتي المشرفين

الأستاذ الدكتور خالد العسس والأستاذ الدكتور عبد النبي بشير

اللذان كانا لي منارة أهتدي بها إلى الأفضل خلال كافة مراحل هذا البحث .وإلى أعضاء لجنة الحكم الأفاضل، الأستاذ الدكتور لؤي أصلان والأستاذة الدكتورة لما البنّا على ما بذلوه من جهود طيبة وإرشادات قيمة أغنت هذه الأطروحة.

كما أشكر كافة الزملاء العاملين في مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية، مخبريين ومهندسين وأساتذة ممثلين بالأستاذ الدكتور لؤي أصلان سند الباحثين، والذي كان وراء خروج هذا العمل إلى حيز الوجود بدعمه ومساندته بإخلاص.

كما أود أن أشكر كافة الزملاء في قسم وقاية النبات اللذين لم يتوانوا عن مد يد العون كلما استطاعوا، وأخص بالذكر الأخت الغالية الدكتورة مريم العبد القادر مع تمنياتي لها بالتوفيق والسعادة.

وأقدم فائق الشكر والاحترام والامتنان للأستاذ الدكتور محمد مصطفى شمس الدين ، وكل الأخوة والأخوات في المركز التطبيقي للنيماتودا الممرضة للحشرات في جامعة القاهرة، لكل ما قدموه لي من العلم والمعرفة.

وإلى كل من قدم المساعدة ولم تسعفني الذاكرة في استحضار أسمائهم، فلهم مني جميعاً جزيل الشكر وعظيم الامتنان.

أمـــانـــــي

فهرس المحتويات

فهرس الجداول

فهرس الأشكال

الملخص:

هدفت هذه الدراسة إلى تقصي النيماتودا الممرضة للحشرات المنتشرة فـي بعـض البـساتين والحقول في محافظة ريف دمشق، واختبار كفاءة بعض عزلات النيماتودا المستخلصة من ترب ريـف دمشق على يرقات فراشة الشمع تحت درجات حرارة مختلفة، وإلى دراسة إمكانية تربيـة النيمـاتودا وإكثارها كمياً على يرقات فراشة الطحين، وكذلك تقييم فاعلية بعض عزلات النيماتودا ضـد يرقـات دودة ثمار التفاح مخبرياً، وتقييم فاعلية بعض عزلات النيماتودا ضد يرقات حفار ساق التفاح مخبريـاً وحقلياً.

ومن أجل تحقيق هذه الأهداف تم القيام بعدة جولات حقلية لكافة مناطق ريف دمشق وذلك فـي الفترة الواقعة بين بداية شهر آذار ونهاية شهر حزيران عام 2008 حيث جمعت 189 عينة تربة مـن بساتين أشجار الفاكهة وبعض حقول المحاصيل وبعض البساتين المزروعة بالحور ومن بعض المناطق المزروعة بالمرج الأخضر.

تم الكشف عن وجود النيماتودا الممرضة للحشـرات بطريقة طعوم فراشة الـشمع، حيـث تمت تربية فراشة الشمع ضمن المخبر، بينت نتائج الكشف أن 8.99% من المجموع الكلـي للعينـات كانت ايجابية، وتـم الحصول على 17 عزلة من النيماتودا الممرضة للحشرات أخذت عيناتهـا مـن 11 منطقة وهي: عسال الورد، حوش عرب، رنكوس، النشابية، خرابو، مرج السلطان، جسر الغيضة، حران العواميد، أبو جرش، حينة، بيت جن.

أظهرت نتائج الانتشار أن أكبر نسبة لوجود النيماتودا في الترب المأخوذة من بساتين مزروعة باللوزيات بنسبة 58.8 %، بعد ذلك البساتين المزروعة بالتفاحيات بنسبة 17.6% وذلك مـن النـسبة الكلية للنيماتودا الموجودة في العينات المدروسة، ثم الترب المأخوذة من الحمـضيات وكانـت نـسبة وجودها 11.7%، ثم الترب المأخوذة من كروم العنب والجوز حيث كانت النسبة لكل منها 5.8%.

لم يتم العثور على النيماتودا الممرضة للحشرات في ترب العينـات المـأخوذة مـن الحقـول المزروعة بالخضار والمحاصيل النجيلية ومن المروج الخضراء ومن تحت أشجار الحور والزيتون.

تبين بنتيجة التعريف والتحديد اعتماداً على بعض الصفات الشكلية التصنيفية وأعراض الإصابة وجود الجنس *Steinernema* بنسبة 35.29 % والجنس *Heterorhabditis* بنسبة 64.70%، ووجد الجنس الأول في 6 عينات بينما وجد الجنس الآخر في 11 عينة.

وتبين من خلال دراسة الصفات المورفولوجية والقياسات البيومترية للذكر والطور اليرقي الثالث لعزلة MSKH المأخوذة من تربة لوزيات في منطقة مرج السلطان والعزلة GLA المأخوذة من تربة حمضيات في منطقة أبو جرش تحديد وتعريف النوع *H.zealandica* Poinar,1990 والذي يعتبر التسجيل الأول لهذا النوع في سوريا.

تمت دراسة الفاعلية الإمراضية لست عزلات من النيماتودا المستخلصة من تربة حقول وبساتين محافظة ريف دمشق بتركيز 250 فرد/مل على يرقات في العمر الأخير لدودة الشمع *Galleria mellonella* على درجات حرارة مختلفة 15-20-25-30 مْ حيث كانت ثلاث عزلات منها تنتمي للجنس *Heterorhabditis* وثلاث عزلات تنتمي للجنس *Steinernema*. تم تقييم الفاعلية بالاعتماد على معرفة معدل الموت ومعدل التكاثر للنيماتودا تحت درجات الحرارة المختلفة.

أظهرت النتائج أن درجة الحرارة 25 مْ هي الدرجة المثلى لكل العزلات المستخدمة وذلك من حيث معدل الموت، كما بينت النتائج أن العزلات التابعة للجنس *Steinernema* أكثر تأقلماً مع درجات الحرارة المنخفضة مقارنة مع العزلات التابعة للجنس *Heterorhabditis* حيث حققت هذه العزلات النسبة الأعلى للموت على درجة حرارة 15 مْ، في حين أن العزلات التابعة للجنس *Heterorhabditis* حققت المعدل الأعلى للموت على درجة حرارة 30 مْ. كما تم حساب الوقت اللازم لقتل 50% من يرقات دودة الشمع على درجات الحرارة المختلفة، وكان هذا الوقت يتناقص مع زيادة درجة الحرارة عند كل العزلات. تم حساب الوقت اللازم لخروج الأفراد المعدية من جثث اليرقات المصابة.

أظهرت النتائج أن أقصر دورة حياة للعزلات كلها كانت على درجة الحرارة 25مْ، أما على الدرجة 15مْ فكانت العزلات التابعة للجنس *Steinernema* هي الأسرع في دورة الحياة، في حين أن العزلات التابعة للجنس *Heterorhabditis* كانت دورة حياتها بطيئة وطويلة عند هذه الدرجة من الحرارة حيث خرجت الأفراد المعدية بعد وقت طويل من حدوث الإصابة. أما عند درجة الحرارة 30مْ فكانت العزلات التابعة للجنس *Heterorhabditis* هي الأسرع في دورة الحياة. كما تم حساب معدل التكاثرللعزلات تحت درجات حرارة المختلفة وبينت النتائج أن العزلات التابعة للجنس *Steinernema* أعطت أكبر كثافة عددية للطور المعدي عند درجة الحرارة 15مْ، كما حققت العزلات التابعة للجنس *Heterorhabditis* أكبر كثافة لأفراد الطور المعدي عند الدرجة 30مْ في حين لم تخرج الأفراد المعدية للعزلة RST التابعة للجنس *Steinernema* عند هذه الدرجة من الحرارة.

وكانت الأفراد المعدية القليلة التي خرجت من العزلتين RM-RTA التابعتين للجنس *Steinernema* عند درجة الحرارة 30مْ حيويتها ضعيفة.

تم اختيار عزلة من الجنس *Steinernema* وثلاث عزلات من الجنس *Heterorhabditis* لاختبار إمكانية التربية الإنتاجية لها على فراشة الطحين *Ephestia kuehniella* وتم استخدام هذه العزلات بخمسة تراكيز 50-100-250-500-1000 فرد معدي/مل، وأظهرت النتائج أن فراشة الطحين على درجة عالية من الحساسية للإصابة بالنيماتودا وأن دورة حياة النيماتودا تنتهي بوقت أقصر عند يرقات فراشة الطحين بالمقارنة مع يرقات فراشة الشمع. كما تم تحديد الإنتاج الكمي من وحدة وزن واحدة من العائل الحشري فكان متوسط إنتاج يرقة فراشة الشمع في وحدة الوزن 0.02غ

يتراوح بين 10-15 ألف فرد معدي، بينما تراوح متوسط إنتاج اليرقة الواحدة من فراشة الطحين بوزن 0.02غ بين 36-57 ألف فرد. أي تفوقت يرقات فراشة الطحين معنوياً في الإنتاج الكمي لأفراد الطور المعدي (من وحدة الوزن 0.02غ) على يرقات فراشة الشمع، وإن هذا التقييم يعد الأول في مجال دراسات النيماتودا الممرضة للحشرات على المستوى العالمي.

أظهرت نتائج التقييم المخبري لفاعلية ثلاث عزلات من النيماتودا الممرضة للحشرات واحدة منها تنتمي للجنس *Steinernema* ضد اليرقات المتشرنقة لدودة ثمار التفاح قدرة كل العزلات المختارة وبكل التراكيز المستخدمة (50-100-250 فرد معدي / مل) على قتل هذا الطور اليرقي لدودة ثمار التفاح، كما دلت نتائج المعاملات المختلفة أن القدرة الأعلى لقتل اليرقات هي للعزلة التابعة للجنس *Steinernema*، وكان معدل التكاثر الأعلى للنيماتودا داخل يرقات دودة ثمار التفاح عند العزلة التابعة للجنس *Steinernema*.

وبهدف تقييم فاعلية عزلتين من النيماتودا الممرضة للحشرات مخبرياً ضد يرقات حفار ساق التفاح، أوضحت نتائج الدراسة القدرة العالية لجنسي النيماتودا على إصابة يرقات حفار ساق التفاح وتحقيق معدل تكاثر كبير للنيماتودا ضمن اليرقات.

في التجربة شبه الحقلية استخدمت طريقتين لتطبيق النيماتودا على أفرع أشجار تفاح مصابة بحفار ساق التفاح، الأولى طريقة حقن معلق النيماتودا داخل الأنفاق النشطة والثانية طريقة رش معلق النيماتودا على الأفرع المصابة، أظهرت النتائج تفوق طريقة الحقن حيث حققت نسبة موت عالية لليرقات قدرها 67.6 %– 76.5% مقارنة بطريقة الرش والتي حققت نسبة موت 20.0% – 25.4%.

في التجربة الحقلية استخدمت طريقتين لتطبيق النيماتودا، طريقة حقن معلق النيماتودا داخل النفق النشط بتركيز 1000 فرد معدي/مل حيث تم حقن 10 مل من المعلق، الطريقة الأخرى وهي وضع يرقات دودة شمع مصابة بالنيماتودا داخل النفق، دلت النتائج على فاعلية الطريقتين في مكافحة حفار ساق التفاح ولكن القدرة الأعلى للمكافحة كانت لطريقة حقن المعلق النيماتودي حيث حقق نسبة موت عالية بالنسبة للجنسين 45.67% – 66.65%.

المقدمة:

تسبب الآفات الزراعية فقداً مهمًا في المحاصيل الزراعية والمنتجات الغذائية، سواء في الحقول أو في البساتين أو في المخازن، ولعل من أهم وأخطر الآفات الزراعية الحشرات، والتي تعتبر مسؤولة عن إحداث حوالي28% من الضرر للمحاصيل الزراعية في الحقول والبساتين والمخازن (أبو طارة،2008)، وتعد مكافحة الحشرات إحدى أوجه التنمية الزراعية، و كان الرائد في ذلك اللجوء إلى استعمال المبيدات الكيميائية، وبدأت الشركات تتنافس على إنتاج أنواع مختلفة من المبيدات وبكميات هائلة، وتمادى المزارعون بالرش الكثيف والعشوائي كماً ونوعاً وبطرق مختلفة حتى أنها خلطت مع مياه الري، وأدى الاستخدام العشوائي للمبيدات إلى ظهور الكثير من الآثار السلبية منها: تلوث البيئة، ظهور الكثير من الأمراض الخطيرة التي تصيب الإنسان، قتل الكثير من الأعداء الحيوية الطبيعية الذي أدى إلى الإخلال بالتوازن الطبيعي بين الآفات وأعدائها الطبيعية، كما ظهرت السلالات المقاومة من الحشرات للمبيدات الكيميائية، وتحول كثير من الحشرات إلى آفات أولية تحدث أضراراً كثيرة للمزروعات، لذلك كان لابد من العودة إلى النظام البيئي والتعامل معه بعقلانية وعدم اللجوء إلى إدخال مواد غريبة وجديدة قدر المستطاع للمحافظة على نظافة البيئة ومنع تلوثها حفاظًا على صحة الإنسان، وكنتيجة لذلك ظهر مفهوم الإدارة المتكاملة للآفات (IPM) Integrated Pest Management، والذي يعتمد المكافحة الحيوية Biological control محوراً أساسياً له من خلال استخدام الكائنات الحية (الحشرات المفترسة والحشرات المتطفلة والكائنات الحية الدقيقة الممرضة للحشرات) لمنع أو تخفيف الخسائرأو الأضرار الناتجة عن الآفات وذلك عن طريق تأثيرها على كثافة الآفة وتقليل مجتمعاتها إلى المستوى غير الضار (Ehlers,1990). إذ تذخر الطبيعة بالكائنات الحية المفيدة التي لها دور كبير في الحد من انتشار الآفات ووقف ضررها، وتشكل النيماتودا الممرضة للحشرات Entomopathogenic Nematodes (EPN) جزءاً رئيسياً هاماً من الأعداء الطبيعيين في الحد من أضرار كثير من الآفات الزراعية والمحافظة على التوازن الطبيعي Natural Balance لأنواع مختلفة من مفصليات الأرجل، وقد تمت معرفة النيماتودا الممرضة للحشرات منذ القرن السابع عشر (Nickle,1984) وتم إدخالها في السنوات الأخيرة في مجال المكافحة الحيوية للآفات الحشرية وخاصة حشرات التربة والحدائق (Tanda and Kaya, 1993)، وتستخدم حالياً بنجاح لمكافحة بعض الآفات الحشرية التي تنتمي لرتب مختلفة مثل حفار ساق التفاح *Zeuzyra pyrina*، حفار ساق الذرة الأوروبي *Pyrausta nubilalis*، دودة اللوز الأمريكية *Heliothes armigera*، الديدان القارضة *Euxoa segetum* ، الديدان البيضاء *Polyphylla phollo*، دودة ثمار التفاح *Cydia pomonella*، الديدان السلكية *Agriotes lineatus*، سوسة النخيل الحمراء *Rhynchophorus ferrugineus*، (Akhurst,1986 , Mracek and Jenser,1988) .

ومن نهاية فترة الستينات وبداية الثمانيـــــنات من القرن الماضي (القرن العشرين) بدأت البحوث المركزة والمكثفة التي أوضحت أهمية النيماتودا الممرضة للحشرات كعامل من عوامل المكافحة الحيوية ذات الكفـــاءة العالية، وتزايد هذا الاهتمام حتى الوقت الحاضر (Bedding *et al*., 1993; Gaugler *et al*.,2000 ; Kaya and Koppenhofer, 2004).

وهناك عدة عوامل شجعت على استخدام أنواع النيماتودا الممرضة للحشرات كبدائل للمبيـــدات الكيميائية ، ويمكن ايجاز أهمها بالنقاط التالية :

1- قدرة النيماتودا على الحركة والبحث بنشاط عن العائل .

2- قتل العائل بمدة تتراوح بين 24–48 ساعة على الأكثر(Gaugler *et al*., 2000).

3- آمنة بيئياً إذ لايوجد أي دليل على قدرة النيماتودا الممرضة للحشرات على إصابة الإنـــسان أو الحيوان.

4- سهلة التطبيق بالمقارنة مع معظم المبيدات الكيميائية.

5- تتضمن دورة حياتها طور معد مقاوم للظروف البيئية غير الملائمة وذو قدرة عالية على البقاء تحت الظروف المثلى من حرارة ورطوبة.

6- إمكانية تخزين هذا الطور لفترات طويلة تحت درجات حرارة منخفضة ويمكن تربية النيماتودا على بيئات صناعية وبالتالي انتاج أنواعها بكميات كبيرة ، وتربيتها بـــشكل كمـــي اقتـــصادي ورخيص (Bedding *et al*., 1993).

ولما كانت الدراسات التي أنجزت عن النيماتودا الممرضة للحشرات وامكانية اســتغلالها فـــي برامج المكافحة الحيوية في سوريا قليلة ونـــادرة (Canhilal *et al*., 2006) (مـسلم ، 2009) فقـــد اقتضى الأمر إلقاء مزيداً من الضوء عليها فنكون على معرفة بالأنواع التي تنتشر في البيئة الـــسورية لاستغلالها واستخدامها كأحد الوسائل الرئيسية في المكافحة الحيوية للآفات الحـــشرية ضـــمن بـــرامج المكافحة المتكاملة.

أهمية البحث:

تعد النيماتودا الممرضة للحشرات من الكائنات الحية ذات الدور الحيوي المهم في المحافظة على التوازن الطبيعي لأنواع مختلفة من الآفات الحشرية، وتستخدم بضعة أنواع من الجنسين *Heterorhabditis* , *Steinernema* كمبيدات ميكروبية حشرية (Microbial Insecticides) وتنتج على نطاق تجاري من قبل عدد من الشركات في العالم (Woodring and Kaya, 1988 ; Georgis, 1990 ; Grewal, 2002) وتتزايد الكميات المصدرة منها إلى عالمنا العربي في الآونة الأخيرة باعتبارها إحدى عناصر الصناعات البيوتكنولوجية المتقدمة، الأمر الذي يميل بالميزان التجاري بين الدول العربية وتلك الدول المصدرة لصالح الأخيرة، تأتي أهمية هذا البحث في التعرف على أجناس أو أنواع النيماتودا الممرضة للحشرات الموجودة في البيئة المحلية (ريف دمشق)، إذ أنه من الضروري معرفة الأنواع الموجودة في البيئة المحلية ودراسة بيولوجيتها بقصد دراسة إمكانية استخدامها قبل إدخال أي نوع مستورد إلى هذه البيئة، ونظراً لقلة الدراسات العلمية للنيماتودا الممرضة للحشرات أو ندرتها في سورية عموماً، فقد كان من المفيد إلقاء مزيداً من الضوء عليها فنكون على معرفة بالأنواع أو الأجناس التي تنتشر في البيئة المحلية لاستغلالها واستخدامها كأحد الوسائل الرئيسية في المكافحة الحيوية للآفات الحشرية ضمن برامج الإدارة المتكاملة للآفات (IPM).

أهداف البحث:

1. تقصي النيماتودا الممرضة للحشرات Entomopathogenic Nematodes المنتشرة في بعض البساتين والحقول في محافظة ريف دمشق .
2. اختبار فاعلية بعض العزلات المستخلصة من تربة البيئة المحلية على يرقات فراشة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* تحت درجات حرارة مختلفة .
3. دراسة إمكانية التربية لبعض العزلات المستخلصة وبتراكيز مختلفة على يرقات فراشة الطحين *Ephestia kuehniella* .
4. تقييم فاعلية بعض عزلات النيماتودا الممرضة للحشرات ضد يرقات دودة ثمار التفاح *Cydia pomonella* مخبرياً .
5. تقييم فاعلية العزلات المحلية للنيماتودا الممرضة للحشرات ضد يرقات حفار ساق التفاح *Zeuzyra pyrina* مخبرياً وحقلياً .

الفصـــل الأول

1- الدراسة المرجعية:

1-1- تقسيم النيماتودا الممرضة للحشرات:

تتبـــع النيماتودا الممرة للحشرات قبيلة Nematoda (Phylum) وهناك أكثر مـــن 30 فـــصلة (Family) مـــن النيماتـــــودا ترتبـــط بطريقـــة أو أخـــرى مـــع الحـــشرات (Adams and Nguyen,2003; Nguyen and Smart, 2004) بعض هـــذه الفـــصـــائل تـــشمل أجناساً وأنواعاً ذات كفاءة عالية كممرضات للحشرات وعائلات أخرى لديها قـــدرات كامنة بدرجـــة مقبولة، وأخرى يمكن أن تثبـــت كفاءتهـــا مـــستقبلاً (Bedding *et al*.,1993; Gaugler,2002; Kaya and Koppenhofer,2004).

تنتمي النيماتودا الممرضة للحشرات إلى رتبة Rhabditida وتضم هذه الرتبـــة العديـــد مـــن الفصائل أهمها: Steinernematidae و Heterorhabditidae.

تتميز أنواع النيماتودا التابعة لهاتين الفصيلتين بأنها ممرضات حشرية إجبارية، وتعيش تكافلياً مع بكتريا تزيد من كفائتها الإمراضية، وبقدرتها الجيدة على التكيف والبقاء في الحقل، ولكل نوع مـــن أنواع النيماتودا التابعة لهاتين العائلتين مدى واسع من العوائل الحشرية تتبع رتـــب مختلفـــة، وتعتبـــر مستحضرات هذه الأنواع بدائل آمنة عن المبيدات التقليدية في مجال مكافحة الحشرات إذ ليس لهـــا أي ضرر على الكائنات الحية غير المستهدفة (Kaya and Koppenhofer, 2004).

تضم فصيلة Steinernematidae جنسين، الجنس *Steinernema* والذي يـــضم 70 نوعـــاً والجنس *Neosteinernema* والذي يضم نوعاً واحداً، وتضم فصيلة Heterorhabditidae الجـــنس *Heterorhabditis* والذي يحوي 13نوعاً.

(Poinar, 1990 ; Poinar *et al*., 1992 ; Grewal *et al*., 2005 ; Nguyen, 2008; Shpiro-Ilan *et al*., 2009).

ويبيـــن الجدول (1) بعض أنواع النيمـــــاتودا الممرضـــــــة للحـــشرات مـــــن فـــصيلتي Steinernematidae , Heterorhabditidae.

بعض أنواع النيماتودا الممرضة للحشرات جدول رقم (1)

العائلة	الجنس	النوع
Steinernematidae	*Steinernema*	*S.carpocapsa* *S.glaseri* *S.cabanum* *S.feltiae* *S.kushidai* *S.lonicaudum* *S.abbasi*
Steinernematidae	*Neosteinernema*	*N.longicurvicauda*
Heterorhabditidae	*Heterorhabditis*	*H.bacteriophora* *H.bervicaudis* *H.indica* *H.megidis* *H.georgeana* *H.zealandica*

(Nguyen, 2008; Shpiro-Ilan *et al*., 2009)

تعتمـــــــــد معظم الدراسات في عملية تصنيف أنواع النيماتودا الممرضة للحــشرات علـــى بعض الصفات الشكلية لطور العدوى (Infective Juvenile) مثل:

طول الفرد كاملاً (L) – المسافة بين فتحة الفم والعقـــدة العـــصبية (NR)– طـــول المـــريء (ES)– طول الذيل (T) – عرض الجسم عند منتصفه (MBW) – المسافة بـــين المقدمـــة الأماميـــة وفتحة الإطراح(EP). بالإضافة إلى بعض الصفات الشكلية للذكر مثل:

طول شوكتا الجماع (SL)– طول الجسم المرشد (GL) – أكبر عرض (W) – عدد الحلمات الموجودة في نهاية الجسم (Liu and Berry , 1996 ; Stoock and Kaya,1996)

كما يمكن استخدام بعض طرق التوصيف الجزيئي في تصنيف أنـــواع وســـلالات النيمـــاتودا الممرضة للحشرات مثل: Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLPs)

1-2- التوزع الجغرافي للنيماتودا الممرضة للحشرات:

أجريت الكثير من الدراسات في العالم والتي تهدف إلى تحري وجـــود النيمـــاتودا الممرضـــة للحشرات، وأشار(Forst) عام 1997 إلى أن هناك بعض الأنواع تنتشر عالمياً وتتواجد فـــي التربـــة المزروعة وغير المزروعة، وبعض الأنواع تنتشر في مناطق محددة من العالم، وتعد أنواع النيمـــاتودا الممرضة للحشرات التابعـــة لفـــصيلتي Heterorhabditidae, Steinernematidae مـــن الأحيـــاء الشائعة بالتربة فقد عزلت من التربة في كثير من أنحاء العالم (Poinar ,1990 ; Hominick, 2002; Chen *et al*., 2004).

وقد تم عزل النيماتودا الممرضة للحشرات في إسبانيا من 33 عينة تربة من أصل 150 عينـــة وحددت فيها أربعة أنواع هي:*S.carpocapsae* , *S.feltiae* , *S.affinis* , *H.bacteriophora* .(Garcia Del pino and Palomo ,1996).

كما أشار Ozer وآخرون عام 1995 إلى وجود النوع *S.feltiae* في سواحل البحـــر الأســـود في تركيا. وتم تسجيل ثلاثة أنواع من النيماتودا الممرضة للحشرات في أنقرة وهي: (Susurluk *et al* ., 2001) *H. bacteriophora* , *Heterorhabditis*.sp *S.feltiae*

وأشار Hazir وآخرون عام 2003 إلى وجـــود الأنـــواع *H.bacteriophora* , *S.feltiae* *S.affine* وأنواع أخرى من الجنس *Steinernema* في تركيا.

وفي الأرجنتين بينت Stock عـــام 1995 وجـــود الأنـــواع -*S.feltiae* , *S.carpocapsae* *H.bacteriophora* , *H.argentinensis* في بعض أنواع الترب، كما تم عزل النوعين الأخيـــرين من 27 حشرة ميتة تتبع رتبتي مستقيمات الأجنحة Orthoptera وغمديات الأجنحة Coleoptera .

يعد النوعان *S.feltiae* , *S.carpocapsae* من الأنواع التي تنتشر في المناطق المعتدلة الحرارة، وينتشر النوع *H.bacteriophora* في حوض المتوسط والمناطق ذات المناخ القاري، وتم عزل النوع *H.indica* من المناطق المدارية وتحت المدارية من العالم (Forst *et al*.,1997).

وفي الأردن تم تسجيل الأنواع *S.anatoliense*, *S.carpocapsae,* *S.feltiae* *H.bacteriophora* (Stock *et al*., 2008).

في فلسطين تم تسجيل النوع *H.indica* (Iraki *et al*., 2000). في العراق سجل النوع *S.carpocapsae* (AL-Jboory and AL-Zubaii, 2006).

وحدد Shamseldean و Abd-Elgawad (1994) وجود الجنس *Heterorhabditis* فـــي مـــصر، كمـــا أشـــار Shamseldean وآخـــرون عـــام 1996 إلـــى وجـــود ثلاثـــة أنـــواع هـــي *H.bacteriophora* , *H.indica* , *H.taysearae* في مصر.

في ســـوريـــا سجل النوع *H.bacteriophora* فـــي مناطق الرقة ودير الزور وأريحا (Canhilal *et al*.,2006). وأشار مسلم عام 2009 إلى وجود النوعين *S.cubanum* , *H.bacteriophora* في بساتين اللوزيات في محافظة اللاذقية.

1-3- دورة الحياة وآلية عمل النيماتودا الممرضة للحشرات:

تعد أنواع النيماتودا الممرضة للحشرات التابعة للجنسين *Steinernema* و *Heterorhabditis* ممرضات إجبارية (Obligate Pathogens) للحشرات في الطبيعة، وتتضمن دورة حياتها الأطوار الحياتية التالية: البيضة، أربع أطوار يرقية (Juveniles Stage) (J1 – J4) والطور الكامل Adult (Stage) والطور المعدي الذي يسمى (DJ)(Dauer Juvenile) أو (IJ) Infective Juvenile وهو الطور اليرقي الثالث، وهو فقط الذي يتواجد خارج جسم العائل ولا يتغذى وله وظيفة واحدة هي العثور على العائل (Kaya and Koppenhofer , 2004).

بعد العثور على العـــائل، يدخل هذا الطور جسم الحشرة من خلال الفتحات الطبيعيـــة (الفم – الشرج – الثغور التنفسية)، وفي بعض الأحيان عن طريق إختراق جـــدار جـــسم الحـــشرة مباشـــرة وهـــذه الحالة من الإختراق خاصة بأنواع الجنس *Heterorhabditis* فقط لوجود ســـن فـــي مقدمـــة الرأس يســـاعدها في ذلك ويواصل الطور المعدي طريقه حتى يصل إلـــى تجويـــف جـــسم الحـــشرة (Insect Hemocoel)، حيث يتم تحرير البكتريا المتعايشة معهـــا إلـــى تجويـــف الجـــسم، وتتكـــاثر البكتريـــــا بـــسرعة فـــي دم الحـــشرة، وتـــرتبط أنـــواع الجـــنس *Heterorhabditis* بالبكتريـــا *Photorhabdus* بينما ترتبط أنواع الجنس *Steinernema* بالبكتريا مـــن الجنس *Xenorhabdus* ، وهناك عدد من الاختلافات بين هذين الجنسين أهمهـــا أن الجنس *Photorhabdus* يعطـــــي اللـــون الأحمـــر الآجـــري ويومض (يلمع لمعاناً طفيفاً) فـــي الظلام داخـــل جسم الحـــشـــرة المـــصابـــة (Poinar, 1979 ; Bedding *et al*., 1993 ; Kaya and Koppenhofer, 2004)

وأنواع البكتريا التابعة لهذين الجنسين هي بكتريا عصوية الشكل متحركـــة سالبـــة لصبغة غـــرام، تعيـــش معيشة لا هوائيـــة اختيارياً، وتتبع لفصيلة Entereobacteriaceae ويبيـــن الجـــدول (2) بعض أنواع النيماتـــودا الممرضـــة للحشـــرات وأنـــواع البكتريا المتكافلة معها (Kaya and Koppenhofer , 2004 ; Shapiro-Ilan *et al* ., 2009)

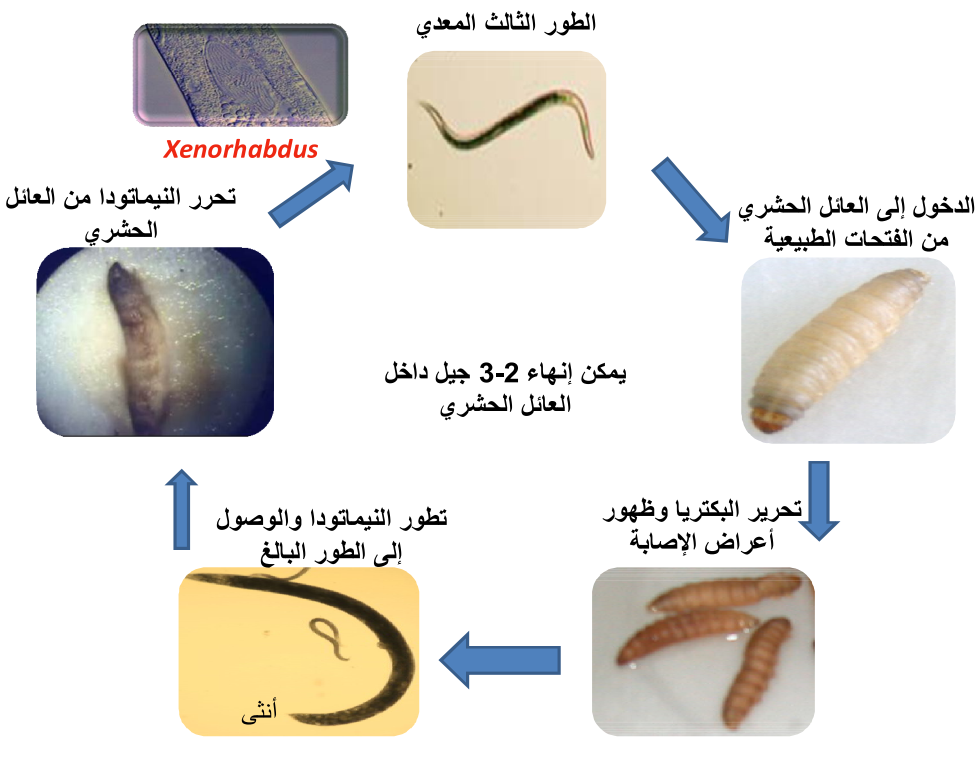
جدول رقم (2) بعض أنواع النيماتودا الممرضة للحشرات وأنواع البكتريا المتعايشة معها .

نوع النيماتودا	نوع البكتريا المتكافلة معها
S.kraussei	*Xenorhabdus bovienii*
S.abbasi	*Xenorhabdus sp*
S.affine	*Xenorhabdus bovienii*
S.carpocapsae	*Xenorhabdus nematophila*
S.cubanum	*Xenorhabdus poinarii*
S.glaseri	*Xenorhabdus poinarii*
H.bacteriopfora	*Photorhabdus luminescens*
H.indica	*Photorhabdus akhurstii*
H.megidis	*Photorhabdus temperata*
H.georgeana	*Photorhabdus luminescens akhurstii*

يعد ارتباط النيماتودا بالبكتيريا على درجة عالية من التخصص (Highly Specific) حيث يرتبط كل نوع من النيماتودا بنوع واحد من البكتيريا (Monoxenic Association) وذلك بسبب أن هذه البكتيريا المرتبطة مع النيماتودا تنتج مضادات ميكروبية تمنع تطور الأنواع البكتيرية الأخرى في هذه النيماتودا (Kaya and Koppenhofer, 2004).

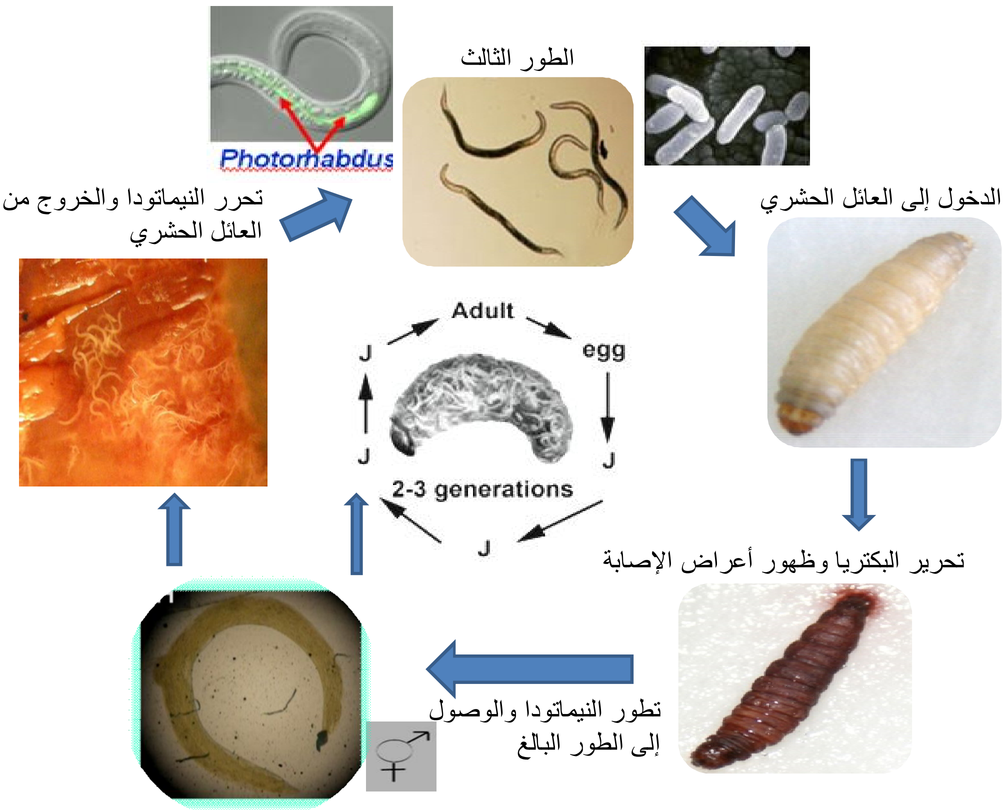
إن علاقة التعايش بين النيماتودا و البكتيريا علاقة منصفة بين الطرفين ، فتقوم البكتيريا بإنتاج مضادات حيوية تجعل بيئة العائل مناسبة لتطور النيماتودا، كما أن هذه البكتريا تشكل غذاءاً رئيسياً للنيماتودا ، في حين تقوم النيماتودا بدور وسيلة نقل للبكتريا فتدخلها إلى تجويف جسم العائل وتثبط بروتينات العائل المضادة للبكتريا (Burnell *et al* , 1994).

يموت العائل خلال 24-48 ساعة بسبب التسمم الدموي (Septicemia).(Poinar,1990)، يتحول بعد ذلك الطور المعدي إلى الطور الرابع الذي يتغذى على البكتريا وأنسجة العائل التي حولتها البكتريا إلى مصدر صالح لغذاء النيماتودا ومن الطور الرابع إلى الأطوار البالغة للجيل الأول والتي تضم ذكور وإناث في أنواع الجنس *Steinernema* الشكل(1). أما في حال الجنس *Heterorhabditis* فإن الأطوار البالغة تكون مخنثة، ويستمر نمو وتطور النيماتودا داخل جسم الحشرة لتقضي جيلاً آخر وهو جيل جنسي (ذكور وإناث) الشكل(2)، بعدها تبدأ النيماتودا بتكوين أفراد معدية جديدة.



الشكل (1) دورة حياة الجنس *Steinernema*

وتشير النتائج إلى أن النيماتودا تكمل من جيلين إلى ثلاثة أجيال داخل جسم العائل حسب تـــوفر الغذاء، وإذا كان الغذاء المتوفر في جسم الحشرة محدوداً فإن البيض المنتج بواسطة إناث الجيـــل الأول يتطور إلى الطور اليرقي الثالث المعدي الذي يترك جسم الحشرة باحثاًعن عائل جديـــد وتـــسمى هـــذه الدورة بدورة الحياة القصيرة (Adams and Nguyen, 2003;Kaya and Koppenhofer,2004)



الشكل (2) دورة حياة الجنس ***Heterorhabditis***

1-4- العوائل الحشرية للنيماتودا الممرضة للحشرات:

تتأثر حساسية بعض الحشرات للإصابة بالنيماتودا بمايلي:

- وجود حواجز مورفولوجية مثل تغطية الثغور التنفسية والتي تمنع دخول النيماتودا، سمك الغشاء المبطن للأمعاء (Gardner *et al*.,1994).
- موانع سلوكية مثل مرور الغذاء بسرعة كبيرة خلال أمعاء الحشرة والسلوك التنظيفي لجسم الحشرة (Akhurst,1986).
- وجود عوامل فسيولوجية تحمي الحشرة مثل تحوصل النيماتودا داخل تجويف جسم عوائلها وإفراز العائل لمواد مضادة للبكتريا (Dunphy and Thurston,1990).
- بالإضافة إلى استراتيجية طور العدوى في البحث عن العائل

1-5- استراتيجيات البحث عن العائل:

يسلك طور العدوى استراتيجيات مختلفة في البحث عن العائل وهذه الاستراتيجيات هي التي تجعلها أكثر أو أقل قابلية لإصابة الحشرة والتي تحدد المدى العوائلي للنيماتودا الممرضة للحشرات (Kaya and Koppenhofer, 2004 ; Gaugler,2002)، ومن هذه الاستراتيجيات:

- الترقب والانتظار (الكمين) Set and wait:

يتميز طور العدوى في هذه الطريقة بقلة الحركة، حيث يكمن لعائله بجانب سطح التربة ولا يستجيب إلى الإشارات والمواد المفرزة من العائل إلا إذا توفرت بكميات كبيرة، وطور العدوى الذي يتميز بهذه الاستراتيجية يصيب الحشرات المتحركة مثل يرقات الديدان القارضة، الحشرات الليلية الموجودة بالقرب من سطح التربة، وأهم أنواع النيماتودا التي تسلك هذا السلوك *S.carpocapsae–S.coptersci*.

- الحركة والانتشار Cruising:

يتميز الطور المعدي للأنواع التي تتصف بهذه الاستراتيجية بالحركة العالية والسريعة والاستجابة إلى المفرزات والإشارات المنبعثة من العائل ومن ثم الاتصال بالعائل، ومثل هذه الأنواع تكون متأقلمة لإصابة أطوار العائل غير المتحركة مثل طور ما قبل العذراء والعذراء للحشرات من رتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera ويمثل هذه المجموعة *H.bacteriophora, S.glaseri*.

- تموج الجسم Body waving:

وهي استراتيجية متوسطة بين الانتظار والانتشار حيث يقوم طور العدوى بإبراز 30-85% من السطح العلوي لجسمه لعدة ثوان وتتبع هذه الاستراتيجية معظم أنواع النيماتودا الممرضة للحشرات مثل *S.riobrava* , *S.feltiae*

- القفز Jumping:

تسلك هذه الاستراتيجية بعض أنواع النيماتودا الممرضة للحشرات للانتشار وإحداث العدوى، حيث تستطيع أن تنتشر أفقياً وعمودياً (Kaya , 1990).

تعكس هذه السلوكيات والاستراتيجيات جميعها مستويات مختلفة من الإيجابيات والسلبيات للأنواع التي تظهرها، فالحركة تزيد من احتمالية التلاقي مع العوائل غير المتحركة ولكن أيضاً تتيح لها التلاقي مع الأعداء الحيوية للنيماتودا، علاوة على ذلك فإن النيماتودا النشيطة تستهلك مدخراتها بشكل أسرع (Downes and Griffin,1996).

1-6- تأثير العوامل البيئية على استمرارية وبقاء النيماتودا الممرضة للحشرات:

هناك العديد من العوامل البيئية التي تؤثر في بقاء واستمرارية النيماتودا الممرضة للحشرات مثل قوام التربة، رطوبة التربة، درجة حرارة التربة، الضغط الأسموزي، الأشعة فوق البنفسجية،

ملوحة التربة، درجة حموضة التربة pH (Kung *et al*., 1990 ; Griffin, 1993, Kung *et al*., 1991 , Grewal *et al*., 1994)

بينت بعض الدراسات التي أجريت في بعض مناطق العالم تأثير التربة على استمرارية وبقاء النيماتودا الممرضة للحشرات في أنواع مختلفة من الترب، فأشار Womersley (1993) الى أن بقاء واستمرارية النيماتودا الممرضة للحشرات يكون أكثر في الترب الرملية ذات الرطوبة المنخفضة وعلى درجة حرارة 15-25مْ مما لو كانت في الترب الطينية، وأشارت دراسات أخرى أن الأطوار المعدية للنيماتودا الممرضة للحشرات تبقى نشطة لعدة أسابيع بعد التطبيق، ثم يبدأ وبالتدريج الانخفاض بأعداد النيماتودا ولايبقى عادة إلا 1% فقط من كمية اللقاح الأصلي بعد ستة أسابيع (Kaya and Koppenhofer, 2004).

إن لصفات النيماتودا الممرضة للحشرات السلوكية والفيسيولوجية دورا مهما في قدرتها على الاستمرار والبقاء، كما أن للعوامل البيئية الخارجية دور كبير وهام في هذه العملية، فأشار Glazer (2002) إلى أن الظروف البيئية غير مناسبة لنمو وتطور النيماتودا الممرضة للحشرات، تدفع بعض أفراد النيماتودا إلى الدخول في سكون، حيث يستطيع طور السكون أن يتحمل درجات الحرارة العالية ونقص الأوكسجين والارتفاع في نسبة الملوحة في التربة (Glazer, 2002) ، حيث تنخفض العمليات الحيوية لها وتستطيع بذلك أن تحافظ على نفسها لفترة طويلة من الزمن، وتكون هذه الأفراد غير ممرضة في هذا الوضع، ولكن عندما تتوافر الظروف المناسبة تتحول الى نيماتودا فعالة ونشطة وقادرة على إحداث العدوى والدخول داخل العائل المناسب.

وأشار Molyneux (1985) و Kung وآخرون (1991)، أن النيماتودا الممرضة للحشرات تبقى نشطة لفترة محدودة بعد التطبيق، وتصل نسبة الفقد الى 50% خلال ساعات عند التطبيق على سطح التربة وذلك بسبب الجفاف والأشعة فوق البنفسجية.

تعد درجات الحرارة العامل البيئي الأكثر أهمية في بقاء واستمرارية النيماتودا الممرضة للحشرات، وتختلف درجة الحرارة المناسبة لنشاط النيماتودا الممرضة للحشرات باختلاف منشأ النيماتودا، فتتحمل النيماتودا ذات المنشأ الاستوائي مثل النوع *S. glaseri* درجات الحرارة المرتفعة أكثر من النيماتودا ذات المنشأ في المناطق المعتدلة مثل النوع *S. carpocapsae* الذي يتحمل البقاء والاستمرار في ترب ذات درجة حرارة منخفضة (Kaya, 1990;Curran, 1993; Griffin, 1993)

وأشار Brown وآخرون (2002) أن النيماتودا الممرضة للحشرات تتجنب الحرارة غير الملائمة بالانتقال الى عمق أكثر في التربة وعدم الخروج من العائل. وتؤثر رطوبة التربة على طور العدوى وفاعليته في احداث العدوى لأنواع النيماتودا الممرضة للحشرات والتي تحتاج الى طبقة رقيقة من الماء في التربة من أجل الحركة ومهاجمة العائل، وبينت بعض الدراسات أن نسبة الرطوبة المناسبة لنشاط نوعي النيماتودا *S. feltiae* *H. bacteriophora* هي 10% وعندما تصل الى 20%

تقل أعداد طور العدوى المهاجم للعائل (Grant and Villant, 2003; Susurluk *et al*.,2001) وإن طور العدوى للنيماتودا الممرضة للحشرات لا يتحرر من داخل جسم العائل عند تواجده في تربة جافة ويبقى في جسم عائله (Koppenhofer *et al*., 1997).

إن لقوام التربـــة وحجم حبيباتها تأثير في نشاط طور العدوى وفعاليته وفترة بقائه، حيـــث تكون حركـــة طـــور العدوى أقل كلما قل حجـــم حبيبات التربة، ان انتقال طـــور العدوى للأنـــواع *S. carpocapsae, S. galseri, H.bacteriophora* في التربة ذات القوام الرملي اللومي أسرع مما هو عليه في التربة ذات القوام الطيني (Kaya, 1990; Portillo and Aguilar, 1999).

تختلف درجة تأثر النيماتودا الممرضة للحشرات بحموضة التربة pH، فبعض أنـــواع عائلـــة Steinernematidae تبقى نشطة وفعالة عند درجة حموضة 4–8 وتقل عنـــد درجـــة حموضـــة 10 (Kung *et al*., 1990)، بينما استمر النوعان *H.bacteriophora*, *S.carpocapsae* عند درجـــة حموضة 6.9 و 8.0 وانخفض نشاطهما على درجة حموضة 5.6 (Ghally, 1995). يختلـــف تـــأثير ملوحة التربة حسب جنس ونوع النيماتودا الممرضة للحشرات، واشارت بعض الدراسات أن التركيـــز العالي من NaCl وKCl وCaCl2 قلل من نشاط وفاعلية النيماتودا *S.glaseri* ولم تؤثر على نوع *H.bcteriophora* (Thurston *et al*., 1994).

تتأثر النيماتودا الممرضة للحشرات بالأسمدة العضوية والكيميائية وذلك بما تسببه مـــن زيـــادة ملوحة للتربة وزيادة في الضغط الأسموزي وافراز لغاز الأمونيوم السام وكانت أنـــواع الجنس *Heterorhabditis* أكثر حساسية من أنواع الجنس *Steinernema* لمثل هـــذه التغيـــرات (Stuart *et al*., 2006). تقوم الأعداء الحيوية الطبيعية بدور كبير في بقاء واستمرار النيماتودا الممرضة للحشرات، خاصة الأعداء الحيوية الموجودة في التربة والتي تتطفل أو تفترس النيماتودا الممرضة للحشرات مثل: النيماتودا المفترسة، الجراثيم الدقيقة، الكوليمبولا، الأكاروسات، الفطريات الممرضة (Kaya, 1990). وهذا ما يفسرأن بقاء واستمرارية النيماتودا الممرضة للحشرات في الترب المعقمة كان أكبر منه في الترب غير المعقمة.

1–7– انتاج النيماتودا الممرضة للحشرات:

أصبح من الممكن التربية الواسعة والإنتاج الكمي للنيماتودا الممرضة للحشرات من أنواع الجنسين *Heterorhabditis* و *Steinernema* الممرضة لأنواع كثيرة من الحشرات، وذلك لسهولة تربية أنواع هذين الجنسين داخل المخابر الحيوية، وهناك طريقتين للتربية:

1-7-1-التربية داخل جسم العائل الحشري *Invivo* production:

من الممكن تربية أنواع الجنـــسين *Steinernema* و *Heterorhabditis* داخـــــل العوائـــل الحشرية، ويستخدم في عملية التربية كعائـــل يرقات دودة الشمع *Galleria mellonella* والتي يمكن

أن تربى بسهولة في المخبر، وهي حساسة للإصابة بالنيماتودا. وأهم الأنواع التي يمكن تربيتها مخبرياً وإنتاجها بشكل موسع على فراشة الشمع *S.feltiae* و *H.bacteriophora* (Dutky *et al*., 1964)

1-7-2-التربية على أوساط صناعية *Invitro* production :

تم تربية النيماتودا الممرضة للحشرات على أوساط غذائية متنوعة، مثل معجون مسحوق البطاطا، عجينة كبد العجل، غذاء الكلب Dog food وعلى أحشاء الدجاج Chicken offal وتستخدم هذه الأوساط كوسط غذائي لتنمية البكتريا التي تتغذى عليها النيماتودا الممرضة للحشرات (Hara *et al*., 1981; Bedding, 1984).

1-8- المستحضرات التجارية:

هناك الكثير من المستحضرات التجارية للنيماتودا الممرضة للحشرات، والتي أنتجت في مناطق مختلفة من العالم، ويبين الجدول (3) بعض هذه المستحضرات والمادة الفعالة في تركيبها. ويمكن خلط النيماتودا الممرضة للحشرات ونقلها في مواد مختلفة مثل الطمي والفيرميكيوليت والمواد الهلامية الجيلاتينية (Alginatclay,Vermiculite,Gel-forming Polyacrylamides) وفي هذه الحالة يمكن تخزينها لمدة 6 شهور على درجة 5مْ، ويجب الأخذ بعين الاعتبار مراقبة الجودة عند عمل منتج تجاري وفي هذه الحالة فإن الأطوار المعدية والبكتريا المصاحبة لها يجب أن تكون قوية التأثير على الحشرات، ويجب أن يظل هذا التأثير ثابتاً طوال فترة الإنتاج وحتى التسويق والتطبيق الحقلي (Georgis,1990).

أهم المستحضرات التجارية للنيماتودا الممرضة للحشرات **جدول رقم(3)**

الاسم التجاري للمنتج	نوع النيماتودا	مكان الإستخدام	اسم الشركة المنتجة
Biosafe	*Steinernema carpocapsa*	المسطحات والحدائق المنزلية	Ortho Solaris Group,USA
Lawn Guardian	*Heterorhabditis bacteriophora*	الحدائق المنزلية، الخضر في البيوت المحمية، المشاتل	Syrtec Inc.Canada
Biosafe	*Steinernema riobrava*	المسطحات والحدائق المنزلية	Pan Britannica Ltd.UK
Exhibit	*Heterorhabditis bacteriophora*	شجيرات الزينة	Ciba-Geigy.w.Europe
Mgnet	*Steinernema feltiae*	فطر عش الغراب	Amcel Spawnmate,USA

9-1- استخدام النيماتودا الممرضة للحشرات في المكافحة الحيوية:

يعتمد نجاح المكافحة الحيوية للحشرات باستخدام النيماتودا الممرضة للحشرات إلى حد كبير على التوافق بين بيئة وحياتية كل من النيماتودا وعائلها الحشري، لذلك فان النيماتودا الممرضة للحشرات تكون ذات كفاءة عالية عندما تكون في الأماكن البيئية التي تمنحها حماية من التقلبات البيئية، فالآفات التي يمكن مكافحتها بالنيماتودا هي تلك التي تعيش في التربة أساسا أو على الأقل التي تقضي طورا من أطوار حياتها في التربة أو تلك التي تعيش على المجموع الخضري للنباتات وتلجأ الى التربة هرباً من ارتفاع الحرارة في ساعات النهار، كالديدان القارضة والحالوش والديدان البيضاء ودودة ورق القطن وديدان لوز القطن (Georgis and Poinar, 1989; Gaugler, 1988)، كما يمكن استخدامها في مكافحة حفارات الساق مثل حفار ساق التفاح وحفار ساق الحور رائق الأجنحة وحفار ساق الملفوف وسوسة النخيل، والتي تحفر أنفاقا داخل جذوع وفروع الأشجار وتكون لهذه الأنفاق فتحات يتوافر بداخلها قدر من الرطوبة يسمح بحركة النيماتودا، كما أن الطبيعة المغلقة للأنفاق توفر للنيماتودا قدرا كبيرا من الحماية من الظروف البيئية غير الملائمة، كما أن طبيعة بعض محاصيل الخضار مثل الملفوف والخس تسمح باستخدام النيماتودا في مكافحة الآفات مثل فراشة الملفوف وأبي دقيق الملفوف الصغير والكبير، حيث أن التفاف الأوراق يحفظ الرطوبة داخلها ويكون ما يشبه الأقماع والتي تحتفظ بالماء مما يسمح باتمام العدوى بهذه الكائنات (Burnell and Stock, 2000).

ومن التجارب الناجحة في هذا المجال في مصر استخدام ست عزلات نيماتودا عزلت من البيئة المحلية المصرية تابعة للجنس *Heterorhabditis* في مكافحة سوسة النخيل الحمراء (Shamseldean and Abd- Elgawad,1994)، كما استخدمت الأنواع *S.riobrava , S.carpocapsae* و *Heterorhabditis*.sp ضد سوسة النخيل الحمراء وكانت نسبة الموت كبيرة (Abbas and Hanounik ,1999).

وفي دراسة لبيان تأثير أربع عزلات من النيماتودا ,*H. bacteriophora* (HP88) *S.riobravis* , *H.indica (EAS59)* , *H. b (EASD98)* على دودة ورق القطن *Spodoptera littoralis* ، وعلى درجات حرارة مختلفة كانت نسبة الموت 100% على الدرجة 25 مْ ، و64% على الدرجة 35 مْ ، وكانت أفضلها *H.b (EASD98)*، (Shamseldean *et al*.,1996).

كما استخدمت عدة أنواع وسلالات تابعة للجنسين *Steinernema , Heterorhabditis* لمكافحة عذارى *Parasarcophaga surcoufi* ضمن التربة وقد أثبتت هذه الدراسة تفوقspp *Steinernema* على الجنس *Heterorhabditis* وكانت نسبة الموت تتراوح بين 94- 26% وذلك حسب النوع والسلالة والتركيز المستخدم (EL-sadawy and Shamseldean, 2001).

وفي دراسة مخبرية لمكافحة يرقات دودة ثمار الخوخ *Grapholita molesta* استخدمت الأنواع *Steinernema carpocapsae , S.feltiae, S.riobrave, H.marelatus* وكانت نسبة الموت على التوالي 67.1 , 75.6 , 87.8 , 63 % (Riga *et al* ., 2006).

كما أجريت تجارب مخبرية لتحديد فاعلية النيماتودا الممرضة للحشرات *Steinernema feltiae N33* ضد العمر اليرقي الثاني والثالث والعذارى بعمر يوم واحد وأربعة وستة أيام لذبابة ثمار الدراق *Bactrocera zonata*. وتراوحت معدلات الموت من 32-88% للعمر اليرقي الثالث بينما تراوحت نسبة موت العذارى من 4-56%، وإن هذه الأعمار بالنسبة لليرقات والعذارى هي الأكثر حساسية للإصابة بالنيماتودا (Mahmoud and Osman, 2007).

من جهة أخرى استخدمت النيماتودا الممرضة للحشرات *H. indica, Steinernema* sp رشاً على النباتات لمكافحة يرقات (Smith) *Spodoptera frugiperda* وحققت نسبة موت 75% (Garcia *et al*., 2008).

في تجربة مخبرية لمكافحة حشرتي *Planococcus citri , Icerya aegyptiaca* استخدمت أنواع النيماتودا *Heterorhabditis bacteriophora*, *H.indica*, *H.baujardi* والنوع *Steinernema abbasi* وحققت النيماتودا *S.abbasi* أعلى نسبة موت وقدرها 75% (Abd El-Rahman *et al*., 2008).

وفي تطبيق حقلي لمكافحة دودة ثمار التفاح *Cydia pomonella* في جنوب إيطاليا استخدمت النيماتودا *Steinernema carpocapsae, Steinernema feltiae* رشاً على جذوع وأغصان الأشجار خريفاً وفي الربيع كان عدد البيوض للآفة منخفضاً جداً وهذا دليل على نجاح المكافحة (Curto *et al*., 2008) .

أظهرت التجارب الحقلية أن استخدام النيماتودا *Heterorhabditis bacteriophora* *Steinernema* sp*, H.indica* بتركيز 1000 طور معدي/مل أكثر فاعلية في مكافحة حفار ساق التفاح *Zeuzera pyrina* من المبيدات الكيميائية السيديال والباسودين بالتركيز الموصى به (Atwa, 1999) .

طبقت في أمريكا النيماتودا *Steinernema scarabaei* على مساحات واسعة من المروج الخضراء الموبوءة بالجعالات من النوع *Anomala orientalis* تمت بعد ذلك مراقبة مجتمع الآفة والمبيد الحيوي ومراقبة التغيرات التي طرأت على الآفة خلال 3–4 سنوات وقد أمكن تسجيل نسبة مكافحة لهذه الآفة بنسبة تتراوح بين 77–100 %(Koppenhofer *et al*., 2008).

استخدمت في سوريا النيماتودا *Heterorhabditis bacteriophora* والنوع المستورد *Steinernema feltiae* في مكافحة كابنودس اللوزيات في ظروف شبه حقلية وحقلية وتم مقارنة

كفائتها في المكافحة مع كفاءة المبيد كونفيدوروكانت النتيجة تفوق العزلة المحلية *H.bacteriophora* على المستوردة *S. feltiae*، ولم يتفوق المبيد كونفيدور على عزلة النيماتودا المحلية (مسلم، 2009).

ويجب الإشارة هنا إلى أن الوقت الملائم لعملية التطبيق الحقلي للنيماتودا هو الصباح الباكر أو الساعات الأولى من المساء أو في ظروف الجو الغائم، وذلك لتجنب الأشعة فوق البنفسجية خلال السطوع الشمسي، أو الحرارة العالية (Gaugler and Boush,1978).

1-10- بعض التطبيقات لاستخدام النيماتودا الممرضة للحشرات:

1-10-1-حفار ساق التفاح (*Zeuzera pyrina* L.(Lepidoptera:Cossidae):

تعد حشرة حفار ساق التفاح *Z.pyrina* من أهم الحشرات التي تسبب أضراراً اقتصادية لأشجار التفاح في منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط، خاصة في سوريا و لبنان على أشجار التفاح، والأجاص، و الزيتون (فتوح وآخرون، 1999).

أشارت بعض الأبحاث إلى أن يرقة واحدة تكفي لقتل الشجرة المصابة الفتية، كما تصبح الأشجار بعمر ثلاث سنوات المصابة بحفار ساق التفاح غير مقاومة لهبوب الرياح، وهذا ما يسبب قلعها وتكسّرها، بينما تصاب الأشجار المعمّرة بشدة بالحشرة وخاصة في السنين الجافة والمناطق الجافة (Pasqualini and Natale 1999; Torrel *et al*., 1983)، هذا من ناحية، أما من الناحية الأخرى فإن الأشجار التي تهاجمها حشرة حفار ساق التفاح تصبح عرضة للإصابة بالكثير من الآفات الأخرى، وتأتي في مقدمتها حشرة من التفاح القطني *Eriosoma lanigerum* التي تستخدم الأنفاق المهجورة لحشرة حفار ساق التفاح كمخبأ أثناء المكافحة الكيميائية، وملجأ لقضاء فترة البيات الشتوي، بالإضافة إلى حفار ساق الصفصاف *Cossus cossus* L، وسوس القلف *Scolytus ruguiosus* (Gatwick, 1992).

تحفر اليرقات في الجذع والأفرع داخل الخشب أنفاقا متجهة من الأسفل نحو الأعلى، ويكون الحفر أثناء الربيع والصيف وحتى الخريف، وتكون أعراض الإصابة الأولى بالحشرة عبارة عن تكسر الأغصان واصفرار وذبول الأوراق، أما الأنفاق فيمكن مشاهدتها في نهاية الحفر في الفروع المحفورة.

إن وجود مجموعة كبيرة من الأغصان المكسورة وذات المجموع الخضري ذي اللون البني، والميت هو الدليل على شدة الإصابة، تحفر اليرقات في الأغصان والفروع العريضة أنفاقاً في اللحاء، وتكون هذه الأنفاق ضيقة وجافة وتتجه نحو الأعلى. ومن أعراض الإصابة وجود ثقب تخرج منه نشارة خشبية حمراء الشكل(3)، وبعض المخلفات اللزجة (سيلان النسغ)، حيث أن اليرقات تنظّف

النفق من الفضلات والنشارة الخشبية بإخراجها إلى الخارج . تؤدي الإصابة بهذه الحشرة إلى ارتفاع شدة تبخر الماء بمقدار 1.7 مرة أكثر من الأشجار السليمة، وتقل عملية التنفس بنسبة 70.8%، وتقل نسبة اليخضور بمقدار 38.7% في الأشجار المصابة. وينخفض نمو شجرة التفاح بنسبة 51% والأجاص بنسبة 40%. يتجاوز



الشكل (3) أعراض الإصابة بحفار ساق التفاح

عرض النفق الذي تحفره اليرقة أكثرمن من 12مم، ويتراوح طوله 7–35 سم (المتوسط :18سم بالتفاح، و13سم بالسفرجل)، كما تنتقل اليرقة من فرع إلى آخر مع تقدمها بالعمر، وهذا ما يسمى بالهجرة اليرقية ليرقات حفار ساق التفاح، وذلك عند جفاف الفرع الذي تحفر فيه والذي بدوره يؤدي إلى تكسره (Pasqualini and Natale, 1999).

المكافحة الحيوية لحفار ساق التفاح:

تم استخدام النيماتودا الممرضة للحشرات لمكافحة حفار ساق التفاح في العديد من دول العالم وقد حققت نجاحاً في هذا المجال، ففي مصر تم اختبار بعض أنواع النيماتودا الممرضة للحشرات في مكافحة هذه الحشرة مثل *Steinernema riobravae, S. abbasi, S. feltiae S. carpocapsae*, ،*Heterorhabditis* SP. SAA1 , (Salih and Abbas, 1998)

كما استخدمت النيماتودا الممرضة للحشرات *S. feltiae* في الصين لمكافحة حفار ساق التفاح وحققت نسبة موت قدرها 97 % (Quin *etal*., 1988)، وفي ايطاليا استخدم نوعين من النيماتودا الممرضة للحشرات لمكافحة حفار ساق التفاح هما: *Steinernema feltia, S. bibionis*، وتراوحت نسبة الموت بين (86.1–89.5) %، كما تم استخدام مزيج من فطر *B. bassiana* (0.5– 1.5)غ/ لكل شجرة) مع النيماتودا *Steinernema spp* وبلغت نسبة الموت 75.5% (Deseo and Docci, 1985 ; Deseo and Miller, 1985) واستخدمت في مصر العزلات التالية لمكافحة حفار ساق التفاح: EGB20, EGG4, EBNE, EIKF التابعة للجنس *Steinernema* والعزلة EGB13 التابعة للنوع *Heterorhabditis bacteriophora* والعزلة EBN16 التابعة للنوع *Heterorhabditis indica* والعزلة NJ التابعة للنوع *Steinernema glaseri* وتراوحت نسبة الموت بين 46.35–95.32 %.

وحيث أن العوامل البيئية من رطوبة وحرارة هي التي تحدد نشاط النيماتودا في مكافحة الآفات فمن البديهي أن تكون النيماتودا المعزولة من بيئة الآفة هي الأقدر على مكافحة هذه الآفة.

1-10-2-دودة ثمار التفاح.*Cydia pomonella* L :

تعد دودة ثمار التفاح من أهم الآفات الحشرية التي تسبب أضراراً اقتصادية لأشجار التفاح والجوز. ينشأ ضرر هذه الآفة نتيجة لتغذية يرقات الحشرة في الثمار مسببة تلفها ورداءة نوعيتها وصفاتها التخزينية، فضلاً عن تعرضها للإصابة بالفطريات والبكتريا، ويزداد تأثير هذه الآفة في المناطق المعتدلة من العالم أكثر منه في المناطق الباردة، وفي البساتين ذات الأشجار المتقدمة بالعمر(الربيعي وآخرون، 2002).

تتغذى يرقات الجيل الأول على الثمار الصغيرة والتي تكون بحجم البندق وحتى الجوزة الصغيرة. تقوم اليرقة الحديثة الفقس بحفر ثقب في قشرة الثمرة، وهي عادةً تقوم بالحفر في مكان التقاء ثمرة مع ثمرة أو ثمرة مع ورقة أو بالقرب من كأس الثمرة، وبعد الاختراق تغطي اليرقة فتحة الدخول بمخلفات الحفرة ومخلفاتها. بعد ذلك تقوم بحفر حجرة التغذية ثم تكمل الحفر باتجاه اللب حتى تصل إلى البذور لتقوم بقرضها والتغذيّ عليها مما يؤدي إلى الخلل في العلاقة بين الثمرة والشجرة والذي ينتهي بتساقط الثمار المصابة، والقليل من الثمار المتساقطة 2-5 % توجد بداخلها اليرقات، ولكن الكثير من اليرقات تغادر الثمار قبل تساقطها. تهاجم اليرقة في هذا الجيل أكثر من 3 ثمار وتسبّب تساقطها، ويمكن أن تصل نسبة الثمار المتساقطة في البساتين المهملة وغير المكافحة حتى 95% (Anonymous,2008; Beers *et al*., 1993).

أما يرقات الجيل الثاني فهي تهاجم الثمار الكبيرة، ويمكن لليرقة الواحدة أن تهاجم 1-3 ثمار ولكن غالباً ثمرتين، ويمكن أن تصل نسبة الثمار المصابة بيرقات الجيل الثاني في الحقول غير المعاملة 70-95%، وغالباً فإن الضرر الذي تحدثه يرقات الجيل الثاني يكون كبيراً لأن اليرقات تصيب الثمار القريبة من النضج وذات القيمة الاقتصادية الكبيرة (Barnett *et al*.,1991).

المكافحة الحيوية ليرقات دودة ثمار التفاح:

تم استخدام النيماتودا الممرضة للحشرات لمكافحة طور اليرقة المتشرنقة لدودة ثمار التفاح وذلك بطريقة الرش بجرعة 0.5- 5 مليون فرد معدي (IJs) /شجرة، وكانت نسبة موت اليرقات داخل المصائد الكرتونية 30%، وكانت نسبة الموت في التطبيق المسائي أعلى بكثير من نسبة الموت في التطبيق الصباحي (Unruh and Lacey,2001). كما تم استخدام النوعين *Steinernema feltiae* و*S. carpocapsae* لمكافحة الحشرة في طور البيات الشتوي، وكانت النتائج جيدة عندما تم التطبيق على درجتي الحرارة 10 و 15مْ (Lacey *et al*, 2005).

أشار كلاً من Dutky و Hough (1955) و Weiser(1955) أنه تم عزل *Steinernema carpocapsae* من اليرقات المتشرنقة لدودة ثمار التفاح، وأن الطور المناسب للمكافحة بالنيماتودا هو طور البيات الشتوي للحشرة، ويفضل أن تجرى المعاملة إما في وقت متأخر

من الخريف أو في بدايـــة الربيـــع، ويعد طور العذراء أقل حســـاسية للإصابة بالنيماتودا الممرضـــة من اليرقـــات (Lacey *et al*, 2006). ويكون النوع *S. carpocapsae* فعـــال فـــــي مكافحـــــة الحشرة على درجـــة حـــرارة بين 10–15 مْ (Unruh and Lacey, 2001).

……………………………………………….

…………………………………………

……………………………………

………………

الفصل الثاني

2- مواد البحث وطرائقه: Materials and Methods

نفذت الدراسة خلال عامي 2008 و 2009

2-1- مكان انجاز البحث Sites of investigation:

العمل المخبري: نفذ العمل المخبري في مخبر الأعداء الحيوية غير الحشرية في مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية في كلية الزراعة- جامعة دمشق.

العمل الحقلي : نفذ العمل الحقلي في البساتين والحقول التابعة لمحافظة ريف دمشق.

2-2- المواد المستخدمة في العمل:

في الجولات الحقلية: مسبار لأخذ العينات الترابية، أكياس بلاستيكية، مجرفة يدوية، بطاقات لاصقة لكتابة المعلومات اللازمة، صندوق حفظ العينات (Ice box).

في العمل المخبري: أطباق بتري مختلفة الأحجام، ورق ترشيح، مناديل ورقية، كؤوس بيكر، ماصات زجاجية وبلاستيكية، شرائح زجاجية، ملاقط وإبر تشريح، سيرنغات بأحجام مختلفة، علب بلاستيكية، مرطبانات بلاستيكية، بخاخ يدوي، مكبرة ضوئية، مجهر ضوئي مجهز بكاميرا.

2-3- طرائق العمل:

2-3-1- تربية دودة الشمع (Lepidoptera-Gallerida) *Galleria mellonella*:

تم الحصول على بيوض فراشة الشمع من أقراص شمع نحل مصابة، ثم وزعت قطع الشمع المصابة على مرطبانات بلاستيكية سعة 2.5 كغ تحتوي على البيئة المغذية المؤلفة من 400غرام دقيق ذرة، 200 غرام دقيق قمح، 100غرام حليب مجفف، 50غرام خميرة جافة، 100غرام عسل نحل، 150غرام غليسرين. حيث خلطت المكونات الجافة أولاً ثم أضيفت إليها المكونات السائلة وخلطت معها حتى أصبحت عجينة متماسكة. تم تغطية المرطبانات بغطائها البلاستيكي بعد تثقيبه بعدة ثقوب للتهوية، وضعت هذه المرطبانات في حاضنة على درجة حرارة 30مْ ورطوبة 65% الشكل(4)، وبعد حوالي 4-5 أسابيع تم الحصول على يرقات دودة الشمع بالعمر الأخير حيث استخدم قسم منها في الكشف عن وجود النيماتودا الممرضة للحشرات في عينات التربة والقسم الآخر وضع في مرطبانات جديدة مغطاة بقطعة قماشية مزدوجة من الشاش حتى تكمل دورة حياتها ويتم الحصول على البيوض

من جديد ، حيث تقوم الفراشات الملقحة بوضع البيوض على قطعة الشاش ،تؤخذ البيــوض وتوضــع على بيئة مغذية من جديد.



الشكل (4) تربية دودة الشمع *Galleria mellonella* في الحاضنة

2-3-2- الكشف عن النيماتودا الممرضة للحشرات في ترب بساتين وحقول ريف دمــشق وتحديــد أجناسها:

2-3-2-1- جمع عينات التربة:

جمعت 189 عينة تربة كل عينة حوالي 1كغ وذلك من بساتين أشجار الفاكهة (مشمش، تفاح، حمضيات، تين، زيتون، رمان، أجاص، عنب، خوخ، جانرك، لوز، توت) وبعض حقول المحاصــيل (خضار مختلفة، شعير، بطاطا، ذرة)، وبعض البساتين المزروعة بــالحور، ومــن بعــض المنــاطق المزروعة بالمرج الأخضر. تم أخذ العينات من بساتين الفاكهة من منطقة ظل الشجرة وأقرب ما يمكن إلى الساق وعلى عمق 5-30 سم باستخدام المسبار، وكان متوسط درجة حرارة التربة على هذا العمق يتراوح بين 12.04 و22.27 مْ في شهر نيسان وبين 16و 26.14 مْ في شــهر أيــار، وبــين 26.13 و30.23 في شهر حزيران.

وضعت كل عينة ترابية في كيس بلاستيكي وسجلت عليها البيانات اللازمة مثل: تاريخ الجمــع - اسم المنطقة - نوع الشجرة أو المحصول - طريقة الري - الآفات إن وجدت، ثم وضعت العينــات

في صندوق حافظ بلاستيكي (ice box) ونقلت إلى مخبر النيماتودا الممرضة للحشرات ليتم الكشف عن وجود النيماتودا الممرضة للحشرات بطريقة طعوم فراشة الشمع.

2-3-2-2- عزل النيماتودا الممرضة للحشرات من عينات التربة:

تم العزل خلال 24ساعة من جمع العينات باستخدام طريقة طعوم فراشة الشمع الموصوفة من قبل Bedding و Akhurst عام 1975 حيث تم نقل كل عينة ترابية من الكيس إلى وعاء بلاستيكي بعمق 10سم وخلطت جيدا بعد ترطيبها بالماء بواسطة مرش يدوي إن احتاج الأمر ذلك، ثم تم وضع من خمس إلى سبع يرقات من دودة الشمع في الطور اليرقي الأخير في أسفل مرطبان بلاستيكي سعة نصف كيلو غرام، ثم أضيفت التربة فوقها حيث وزعت عينة التربة الواحدة على أربع مرطبانات بأسفل كل منها من 5-7 يرقات من دودة الشمع، وسجل عليها المعلومات الموجودة على الكيس البلاستيكي، بالإضافة إلى تاريخ وضع اليرقات، ثم وضعت المرطبانات في الحاضنة على درجة الحرارة 25درجة مئوية ورطوبة 65%، لمدة أسبوعين الشكل(5)، تم الكشف عن اليرقات الميتة كل ثلاثة أيام حيث أخذت اليرقات الميتة وتم تعقيمها سطحيا في محلول هيبوكلوريت الصوديوم 1% ثم وضعت على أطباق الاستخلاص بطريقة مصيدة وايت (white trap) (white،1927).



1



2



3



4



5

وضع عينات التربة في الحاضنة على درجة حرارة 25مْ

1-ترطيب عينات التربة بالماء 2-وضع يرقات دودة الشمع في أسفل المرطبان 3-إضافة التربة فوق اليرقات 4-وضع المرطبانات داخل كيس بلاستيكي مع كتابة المعلومات على المرطبان 5-وضع المرطبانات في الحاضنة

الشكل (5) عزل النيماتودا الممرضة للحشرات من عينات التربة

• تقنية مصيدة وايت **white trap technique:**

تم اتباع هذه التقنية للحصول على أطوار النيماتودا المعدية و تتكون هذه المصيدة مـن طبـق بتري 9سم وفي وسطه طبق بتري صغير مقلوب تم وضع ورقة ترشيح فوقه الشكل (6) ، ثم أضـيف إليها 5 مل من محلول الفورمالين بتركيز 0.1%، ثم وضعت اليرقات الميتة والمعقمة سـطحيا علـى ورقة الترشيح وتمت تغطية طبق البتري وكتبت عليه البيانات اللازمة وتاريخ الاستخلاص، وحضنت الأطباق على الدرجة 25 – 27 مْ، تم الكشف عن الأطوار المعديـة IJ (Infective jevunile) بعـد 10 –15 يوم حيث تم حصادها وتطبيق فرضيات كوخ عليها للتأكد أنها نيماتودا ممرضة .



شكل (6) تقنية مصيدة وايت

2-3-3-تصنيف النيماتودا الممرضة للحشرات:

تم تحديد جنس النيماتودا الممرضـة للحشرات اعتمادا على أعـراض الإصابـة وبعـض العلامـات المميـزة لكـل جـنس (Nguyen and Smart,1996;Adams and Nguyen,2002;Nguyen and Hunt,2007) حيـث تـم تحديـد الأجنـاس *Steinernema* و *Heterorhabditis* اعتماداً على المواصفات التالية:

- موقع فتحة الإطراح عند الطور المعدي.
- وجود أو عدم وجود سن واضح في مقدمة الرأس عند الطور المعدي.
- وجود كيس السفاد عند الذكرأو عدم وجوده.
- لون يرقة دودة الشمع المصابة.

تم تشريح يرقات دودة الشمع المعدية بالنيماتودا في محلول ملحي 0.9% للحصول على أطوار النيماتودا المختلفة (خنثى، إناث، ذكور) وحصلنا على أفراد الطور الثالث من مصائد وايت، تم قتل أفراد النيماتودا بالماء الساخن 60 مْ ، ثم وضعت في محلول التاف TAF (2 مل تراي ايتانول أمين + 7مل فورمالين + 91 مل ماء مقطر) لمدة 24 ساعة ، وبعدها في محلول مضاعف التركيز من TAF (2 مل تراي ايتانول أمين + 7 مل فورمالين +45.5 مل ماء مقطر)، ثم وضعت لمدة يومين في محلول سينهورست (1مل غليسرين + 20 مل ايتانول + 79 مل ماء) ومن ثم وضعت في فرن 65 مْ ضمن محلول (5 مل غليسرين +95 مل ايتانول) لمدة يومين.

تم اصطياد 30 فرد من أفراد النيماتودا وتحميلها على الشرائح ومن ثم أخذت القياسات اللازمة للتصنيف مثل: طول اليرقة Length (L)، أكبر عرض لها Maximum Body Width (MBW)، المسافة مابين المقدمة الأمامية للنيماتودا وفتحة الإطراح Excretory Pore (EP)، المسافة بين المقدمة الأمامية والحلقة العصبية Nerve Ring (NR)، طول المريء Oesophagus length (ES)، طول الذيل Tail (T) وتم منها حساب النسب التالية a=L/MBW و b=L/ES c=L/T و D%=(EP/ES)X100 و E%=(EP/TX)100 . وبالنسبة للذكر طول أشواك التسافد Spicule length (SL)، طول الجسم المرشد Gubernaculum length (GL)، أكبر عرض (W)، العرض عند فتحة الإخراج الهضمية Anal Body Width (ABW) وتم منها حساب النسبة GS=GL/SL. حيث تم تصنيف عزلتين تتبع الجنس *Heterorhabditis* حسب Poinar عام 1990.

كما تم أخذ صور بالمجهر الالكتروني لأهم المعالم التصنيفية عند الخنثى والذكر وذلك في المركز التطبيقي للنيماتودا الممرضة للحشرات في القاهرة.

2-3-4- تحليل التربة:

تم تحليل التربة للعينات الحاوية على نيماتودا ممرضة للحشرات وبعض عينات التربة غير الحاوية على ذلك في مخبر التربة في قسم الأراضي في كلية الزراعة – جامعة دمشق، لمعرفة خصائص التربة مثل درجة الحموضة وقوام التربة ونسبة المادة العضوية.

2-3-4-1- حساب التكرار النسبي:

تم حساب التكرار النسبي لكل جنس من الجنسين بتطبيق المعادلة التالية:

التكرار النسبي للجنس Steinernema=عدد العينات المحتوية على الجنس Steinernema/عدد العينات الكلي×100

التكرار النسبي للجنس Heterorhabditis= عدد العينات المحتوية على الجنسHeterorhabditis/عدد العينات الكلي×100

2-3-5- دراسة تأثير درجات الحرارة على فاعلية النيماتودا الممرضة للحشرات من الجنسين *Heterorhabditis* و *Steinernema*:

تم دراسة تأثير درجات حرارة مختلفة (15-20-25-30 مْ) على إمراضية بعض عزلات النيماتودا الممرضة للحشرات من الجنسين *Heterorhabditis* و *Steinernema* والتي حصلنا عليها من عملية الحصر في بساتين وحقول ريف دمشق وهي:

- العزلات RST- RM – RTA من الجنس *Steinernema*
- العزلات PHA – MHA – JKH من الجنس *Heterorhabditis*

تمت التجربة في حاضنة مخبرية باستخدام التركيز 250 طور معدي/ مل على رطوبة 60%، باستخدام أطباق بتري قطرها 15سم حيث حضرت التراكيز المطلوبة من عزلات النيماتودا المستخدمة ثم وضعت ثلاثة أوراق ترشيح في أسفل كل طبق وأضيف لها 5 مل من محلول النيماتودا المحضر بالتركيز المطلوب، ثم وضع في كل طبق عشر يرقات من دودة الشمع ، تم تغطية أطباق بتري ودونت عليها المعلومات كاملة (اسم العزلة، درجة الحرارة، رقم المكرر ....) تم عمل ثلاثة مكررات من كل عزلة وذلك بالنسبة لكل درجة حرارة بالإضافة لشاهد أضيف فيه الماء بدلاً من النيماتودا.

أخذت القراءات بعد 24 ، 48، 72، ساعة ثم بعد 5أيام وذلك بالنسبة لعدد اليرقات الميتة، ثم وضعت اليرقات الميتة على أطباق الاستخلاص (مصيدة وايت) لاستقبال الأطوار المعدية من النيماتودا حيث تم تسجيل تاريخ خروج الطور المعدي من كل طبق، تاريخ انتهاء خروج الأفراد المعدية وبالتالي الفترة الزمنية التي استغرقتها الأفراد المعدية للخروج من جسم اليرقات، تم عد أفراد الطور المعدي التي خرجت من يرقات دودة الشمع وذلك في كل طبق بتري (Shamseldean , 1994).

2-3-6-التربية المخبرية لبعض عزلات النيماتودا على يرقات فراشة الطحين:

تم اختبارإمكانية استخدام يرقات فراشة الطحين لتربية وإكثار بعض عزلات النيماتودا الممرضة للحشرات والمعزولة من ترب ريف دمشق بدلاً من يرقات دودة الشمع، أجريت العدوى بالعزلات : VH11 ، PHA ، DKH9، من الجنس *Heterorhabditis* والعزلة RST من الجنس *Steinernema* حيث جهزت خمسة تراكيز من كل عزلة: 50-100-250-500-1000 فرد معدي/مل

تم وضع ورق ترشيح ضمن أطباق بتري بقطر 15سم، رطب ورق الترشيح بواسطة 5مل من محلول النيماتودا المجهزثم وضع فوقها 10 يرقات بالعمر الأخير من فراشة الطحين، حيث تم عمل ثلاث مكررات من كل تركيز وذلك بالنسبة لكل عزلة من العزلات المستخدمة في الاختبار، غطيت الأطباق وسجلت عليها البيانات اللازمة ووضعت في الحاضنة تحت الدرجة 25مْ، بصورة مماثلة تم إجراء العدوى بنفس العزلات والتراكيز على يرقات دودة الشمع الكبرى وذلك بوضع 10 يرقات بالعمر اليرقي الأخير في كل طبق بتري في أسفله ورق ترشيح مرطب بواسطة 5مل من المحلول

النيماتودي، أيضاً تم عمل ثلاث مكررات بالنسبة لكل عزلة ولكل تركيز. أخذت القراءات بالنسبة لعدد اليرقات الميتة بعد 24، 48، 72ساعة ثم وضعت اليرقات الميتة على أطباق الاستخلاص حسب تقنية مصيدة وايت، تم تدوين تاريخ بدء خروج أفراد الطور المعدي من اليرقات وأيضاً تاريخ انتهاءه وبالتالي الفترة اللازمة لذلك كما تم إحصاء عدد أفراد النيماتودا المستحصل عليها من اليرقات في كل طبق وبالتالي معرفة عدد الأفراد من الطور المعدي الخارجة من كل يرقة وذلك باستخدام ماصات ميكرونية لهذا الغرض، تم تحليل النتائج إحصائياً وبالتالي معرفة امكانية استخدام يرقات فراشة الطحين كعائل لتربية النيماتودا وإكثارها.

2-3-7- تقييم فاعلية بعض عزلات النيماتودا على يرقات حفار ساق التفاح ودودة ثمار التفاح:

2-3-7-1- إعداد مادة العدوى:

تم إكثار بعض عزلات النيماتودا المستخلصة من ترب بساتين محافظة ريف دمشق على يرقات دودة الشمع الكبرى *G.mellonella* وذلك للحصول على أعداد الطور اليرقي المعدي الثالث بغرض تقييم فاعليتها ضد يرقات حفار ساق التفاح ودودة ثمار التفاح، ولهذه الغاية جهز محلول نيماتودا بتركيز 200 فرد من الطور المعدي في الميليلتر، وزعت يرقات دودة الشمع على أطباق بتري وضع في أسفلها مناديل ورقية رطبت بإضافة 5 مل من المحلول النيماتودي المجهز، حيث وضع في كل طبق بتري 10 يرقات من دودة الشمع الكبرى في الطور اليرقي الأخير، غطيت الأطباق وكتبت عليها المعلومات اللازمة ثم وضعت في الحاضنة على درجة حرارة 25مْ، تم استخلاص الطور اليرقي المعدي للنيماتودا من يرقات دودة الشمع المعداة باتباع تقنية مصيدة وايت حيث تم الحصول على أعداد كبيرة من النيماتودا خزنت في البراد على الدرجة 10مْ لحين استخدامها (Woodring and Kaya ,1988).

2-3-7-2- فاعلية العزلات المدروسة على يرقات دودة ثمار التفاح:

تم الحصول على يرقات دودة ثمار التفاح المتشرنقة (يرقات مكتملة النمو داخل الشرنقة) من بستاني تفاح بمنطقتي عرامو وربيعة (محافظة اللاذقية) وذلك بوضع مصائد كرتونية متعرجة على ساق وأفرع /10/ أشجار مصابة بحشرة دودة ثمار التفاح من كل بستان، وتم وضع 5-7 مصائد كرتونية متعرجة على كل شجرة شكل (7). تم وضع المصائد الكرتونية الحاوية على الشرانق في صندوق حفظ العينات لحين وصولها إلى مخبر الأعداء الحيوية غير الحشرية في مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية، حيث تم جمع الشرانق من المصائد لإجراء الاختبارات اللازمة.استخدمت عزلتان من الجنس *Heterorhabditis* وهي أجاص PHA ، VH، وعزلة من الجنس *Steinernema* وهي RST لاختبار فاعليتها ضمن الظروف المخبرية في مكافحة يرقات دودة ثمار التفاح حضر محلول نيماتودي من كل عزلة من العزلات المستخدمة وبالتراكيز: 50 فرد معدي/مل – 100 فرد معدي/مل-250 فرد/مل، وضعت مناديل ورقية داخل اطباق بتري بقطر 15سم رطبت هذه المناديل بواسطة 5مل من المحلول النيماتودي ثم وضعت فوقه 10 شرانق لدودة ثمار التفاح، غطيت الأطباق وسجلت عليها البيانات اللازمة ثم وضعت في الحاضنة تحت الدرجة 25مْ، تم عمل ثلاث مكررات من كل تركيز بالنسبة لكل عزلة من العزلات بالإضافة إلى شاهد أضيف إليه الماء فقط، وضعت اليرقات الميتة على أطباق الاستخلاص للحصول على أفراد الطور المعدي، أخذت القراءات اللازمة لهذا الاختبار (عدد اليرقات الميتة، عدد أفراد النيماتودا الخارجة من اليرقات، زمن خروج أفراد النيماتودا)، حللت النتائج إحصائياً لمعرفة أفضل العزلات وأفضل التراكيز.



الشكل (7) المصائد الكرتونية المتعرجة على الاشجار

2-3-7-3- فاعلية العزلات المدروسة على يرقات حفار ساق التفاح:

تم اختبار فاعلية بعض عزلات النيماتودا على يرقات حفار ساق التفاح مخبريا وحقليا:

2-3-7-3-1-الدراسة المخبرية:

تم جمع عينات مصابة بحفار ساق التفاح من بستاني تفاح بمنطقتي عرامو وربيعة (محافظة اللاذقية)، وتم جمع الأجزاء المصابة من كافة مستويات الشجرة من الأفرع بعمر سنة، وبلغ عدد اليرقات التي تم جمعها حوالي /100/ يرقة وكانت جميع اليرقات المختبرة بطول3سم تقريباً.

العزلات المستخدمة: RST من الجنس *Steinernema* و PHA من الجنس *Heterorhabditis*

تم تحضير مادة العدوى ومن ثم تجهيز تركيزين من كل عزلة من العزلات 50 فرد معدي/مل، 100 فرد معدي/مل.

عرضت يرقات حفار ساق التفاح للعدوى بهذه العزلات وبكلا التركيزين وذلك بوضع خمس يرقات في طبق بتري فيه ورق ترشيح، ثم أضيف 2مل من المعلق النيماتودي بالتركيز 50 فرد/مل وتكون بذلك تعرضت كل يرقة لجرعة مقدارها تقريباً 10 فرد معدي/يرقة وتم عمل ثلاث مكررات من كل عزلة وشاهد أضيف فيه الماء بدلاً من المعلق النيماتودي، بالنسبة للتركيز 100 فرد/مل فقد أضيف أيضاً 2 مل من مادة العدوى وبهذا تكون كل يرقة تعرضت لجرعة قدرها 200 فرد معدي/يرقة، أخذت قراءات الموت بعد 48 ساعة ثم نقلت اليرقات الميتة إلى مصائد وايت (Woodring and Kaya ,1988)، تم حساب النسبة المئوية للموت ثم تم تقدير أعداد النيماتودا الناتجة منها، والفترة التي استمرت فيها بالخروج، حللت النتائج إحصائياً لمعرفة أفضل عزلة وأفضل تركيز.

2-3-7-3-2- الدراسة شبه الحقلية:

تم إجراء هذه التجربة لاختبار قدرة النيماتودا الممرضة للحشرات على الوصول إلى اليرقات داخل النفق وقتلها، حيث تم جمع حوالي 30 فرع من أشجار تفاح مصابة بحفار ساق التفاح، كل فرع يحتوي على الأقل نفق نشيط واحد.

استخدمت نفس العزلات التي تم تطبيقها مخبرياً RST (*Steinernema*) و PHA (*Heterorhabditis*) وذلك بتركيز 1000 فرد معدي/مل، استخدمت طريقتان لتطبيق النيماتودا طريقة حقن المعلق النيماتودي داخل النفق النشط بواسطة محقن يدوي سعة 5 مل بحيث يضمن وصول أفراد النيماتودا إلى اليرقة داخل النفق، الطريقة الثانية وهي رش الأفرع المصابة بسائل النيماتودا بواسطة مرش يدوي سعة 1 ليتر، تم تخصيص 3 أفرع بطول 40-50 سم لكل مكرر، تم عمل ثلاث مكررات من كل عزلة للطريقة الواحدة، حفظت الأفرع بدرجة حرارة المخبر 25-30 مْ ثم أخذت النتائج بعد أسبوع من التطبيق حيث تم كسر الأفرع للوصول إلى اليرقات.

2-3-7-3-3- التطبيق الحقلي:



الشكل (8) حقن المعلق النيماتودي داخل النفق

أجريت تجربة حقلية لمكافحة حفار ساق التفاح بالنيماتودا وذلك في أحد حقول الزيتون في منطقة نوى التابعة لمحافظة درعا، حيث كانت أشجار الزيتون مصابة بحفار ساق التفاح، واستخدمت لهذا الغرض نفس العزلات التي استخدمت في الدراسة المخبرية وتم تطبيقها بطريقتين: الأولى حقن المعلق النيماتودي بتركيز 1000فرد/مل في النفق الشكل(8)

أما الثانية فكانت بوضع يرقات دودة الشمع الكبرى مصابة بالنيماتودا مع قطعة قطن مبللة بالماء للحفاظ على الرطوبة داخل النفق وفي كلا الطريقتين تم إغلاق النفق بعد المعاملة بالطين.

تم الكشف عن الأنفاق المعاملة بعد خمسة أيام وحسبت نسبة الموت.

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

3-1 تواجد النيماتودا الممرضة للحشرات في بساتين وحقول ريف دمشق وتحديد أجناسها وأنـــواع بعضها :

بلغ عدد العينات التي تم جمعها /189/ عينة، وكان عدد العينات السلبية غير المحتويـــة علـــى نيماتودا ممرضة للحشرات) /172/ عينة، وعدد العينات الايجابية الحاوية علـــى نيمـــاتودا ممرضـــة للحشرات /17/ عينة بنسبة 8.99%، وهذه النتيجة تخالف النتيجة التي تم التوصل إليهـــا فـــي المـــسح الذي أجري في مناطق مختلفة من القطر والتي بينت أن نسبة العينات الايجابية التـــي تحتـــوي علـــى نيماتودا ممرضة للحشرات كانـــت حـــوالي 2.37% (Canhilal *et al* ; 2006). توزعـــت العينـــات السابقة كما يلي: 158 عينه جمعت من بساتين أشجار الفاكهة والزيتون وكـــروم العنـــب، كـــان عـــدد العينات الحاوية نيماتودا ممرضة للحشرات /16/ عينة بنسبة 10.12%. وعدد العينات التـــي جمعـــت من حقول النجيليات (شعير وذرة) /4/ عينات كانت كلها خالية من النيماتودا الممرضة للحشرات.

وكان عدد العينات التي جمعت من حقول الخضار /5/ عينات كانت كلها سلبية وخالية من أي جنس من أجناس النيماتودا الممرضة للحشرات . وبلغ عدد العينات التي جمعت مـــن بـــساتين الجـــوز /10/ عينات، ثلاثة منها جمعت من منطقة "بزينة" وكانت جميعها خالية من أي جـــنس مـــن أجنـــاس النيماتودا الممرضة للحشرات. و/7/ عينات جمعت من بساتين الجوز في منطقة خرابو احتوت عينـــة واحدة منها على نيماتودا ممرضة للحشرات وكانت النسبة 10% وأما العينات التي جمعت من بـــساتين أشجار الحور فكان عددها /7/ عينات كانت جميعها خالية من النيماتودا الممرضة للحشرات، وتم جمع عينة واحدة من أحد حقول البطاطا في منطقة كناكر و كانت خالية من النيماتودا الممرضة للحـــشرات. وقد قمنا بترميز العزلات التي حصلنا عليها تبعاً للمناطق والأشجار التي جمعت مـــن تحتهـــا لتـــسهيل العمل الجدول رقم (4) والجدول رقم(5)

العزلات التابعة للجنس *Heterorhabditis* **جدول رقم (4)**

نوع الشجرة واسم المنطقة	دراق جسرالغيضة	مشمش جسر الغيضة	عنب حينة	مشمش بيت جن	أجاص حوش عرب	مشمش حوش عرب	جانرك عسال الورد	مشمش أبو جرش	حمضيات أبو جرش	خوخ مرج السلطان	جوز خرابو
الرمز	DKH	MG	VH	BJM	PHA	MHA	AAG	MA	GLA	MSKH	JKH

العزلات التابعة للجنس *Steinernema* **جدول رقم (5)**

نوع الشجرة اسم المنطقة	دراق بيت جن	مشمش رنكوس	تفاح رنكوس	تفاح سهل رنكوس	خوخ نشابية	مشمش حران العواميد
الرمز	DBJ	RM	RTA	RST	NKH	HAM

يوضح الجدول(6) مناطق جمع العينات والمحاصيل والأشجار التي جمعت منها العينات ونتيجة البحث عن النيماتودا، كما يبين الشكل(9) المناطق التي وجدت فيها النيماتودا الممرضة للحشرات.

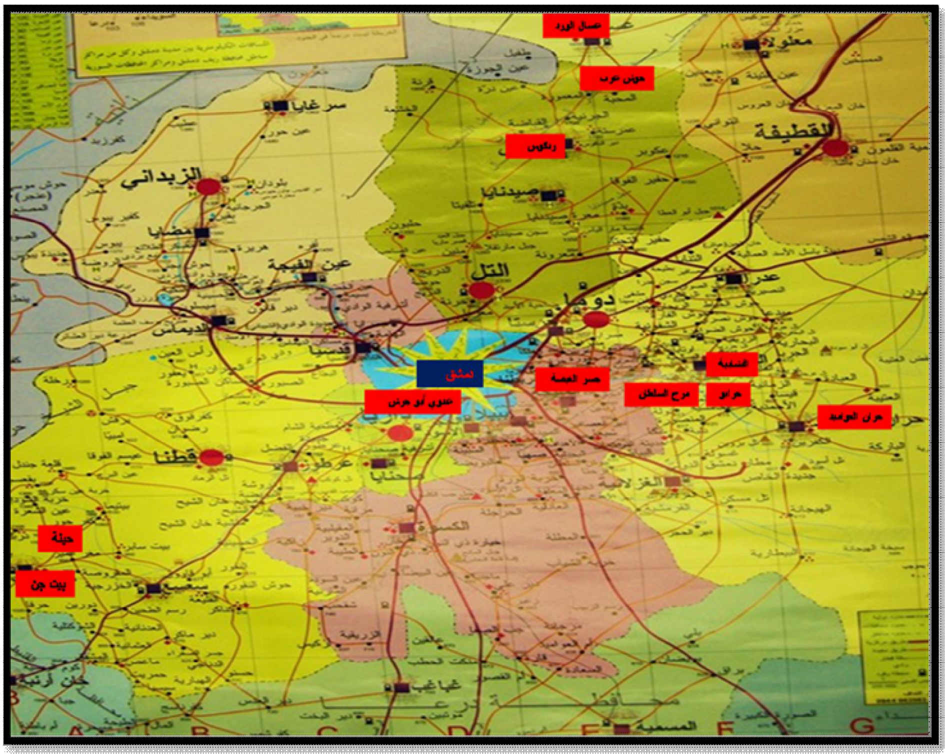
الجدول(6): مناطق جمع العينات والمحاصيل والأشجار التي جمعت منها العينات ونتيجة وجود أحد أجناس النيماتودا المعزولة.

المنطقة	عدد العينات الكلي	عدد العينات المصابة	نوع الشجرة	*Heterorhab-ditis*	*Steinern-ema*
الأحمدية	4	–	زيتون – عنب	–	–
حوش سلمان	3	–	مشمش–لوز	–	–
جربا	2	–	حور – رمان	–	–
زبدين	1	–	زيتون	–	–
دير العصافير	3	–	دراق – لوز	–	–
الدوير	3	–	مشمش – خوخ	–	–
حتيتة التركمان	2	–	دراق – خوخ	–	–
جسر الغيضة	4	**2**	دراق	**1**	–
			مشمش	**1**	
الزبداني	3	–	تفاح – مشمشس	–	–
سرغايا	6	–	تفاح – أجاص	–	–
مضايا	2	–	كرز	–	–
بقين	2	–	كرز – مشمش	–	–

المنطقة	عدد العينات الكلي	عدد العينات المصابة	نوع الشجرة	***Heterorhab-ditis***	***Steinern-ema***
عين الخضرة	5	–	عنب – حور	–	–
عين الفيجة	5	–	توت – دراق	–	–
جديدة عرطوز	3	–	تين– توت– زيتون	–	–
عرطوز	2	–	رمان – خضر	–	–
دروشا	1	–	حور	–	–
خان الشيح	1	–	شعير	–	–
كناكر	2	–	بطاطا – مرج اخضر	–	–
قعسم	3	–	دراق – كرز	–	–
حينة	3	**1**	عنب	**1**	–
مزرعة بيت جن	3	–	توت –كرز	–	–
بيت جن	4	**2**	مشمش	**1**	
			دراق		**1**
سعسع	3	–	كرز –توت	–	–
عسال الورد	4	**1**	جانرك	**1**	–
رنكوس	7	**2**	مشمش	–	**1**
			تفاح	–	**1**
سهل رنكوس	6	**1**	تفاح	–	**1**
تلفيتا	9	–	مشمش–مرج أخضر	–	–

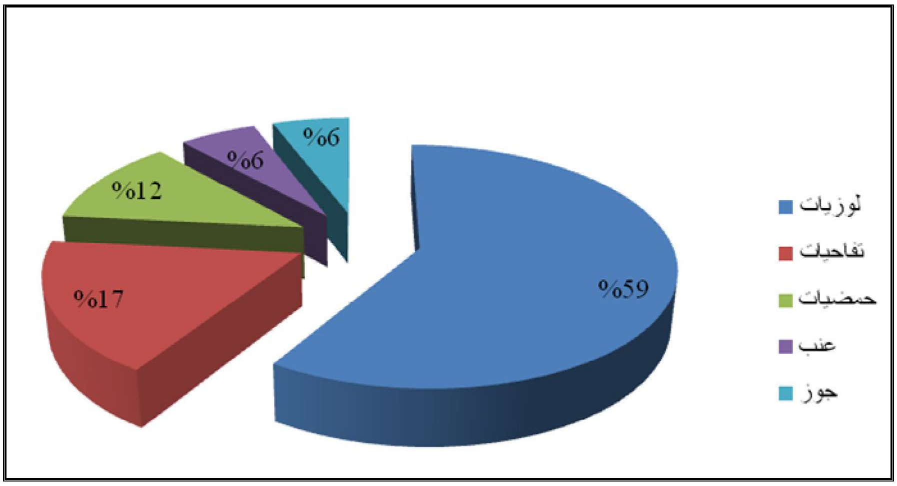
المنطقة	عدد العينات الكلي	عدد العينات المصابة	نوع الشجرة	*Heterorhab-ditis*	*Steinern-ema*
حلبون	3	–	تفاح– مرج أخضر	–	–
حوش عرب	5	**2**	أجاص	**1**	–
			مشمش	**1**	
أبو جرش	9	**2**	حمضيات	**1**	–
			مشمش	**1**	–
دوما	5	–	زيتون–تين – رمان	–	–
حرستا	3	–	زيتون–رمان	–	–
مديرة	3	–	حور–خضر مختلفة	–	–
مسرابا	4	–	زيتون–رمان	–	–
الشيفونية	5	–	أجاص–تين	–	–
الريحان	2	–	عنب – رمان	–	–
النشابية	6	**1**	خوخ	–	**1**
العتيبة	4	–	جانرك– مشمش	–	–
عربين	2	–	حور–زيتون	–	–
عقربا	3	–	خضرمتنوعة مرج أخضر	–	–
خربة الورد	2	–	تفاح – لوز	–	–
حران العواميد	4	**1**	مشمش	–	**1**

المنطقة	عدد العينات الكلي	عدد العينات المصابة	نوع الشجرة	***Heterorhab-ditis***	***Steinern-ema***
غسولة	5	–	تفاح – أجاص	–	–
بزينة	4	–	جوز – حور	–	–
بيت نايم	6	–	خوخ – حور	–	–
حوش الصالحية	3	–	نجيليات (شعير– ذرة)	–	–
المحمدية	2	–	لوز – خوخ	–	–
خرابو	7	**1**	جوز	**1**	–
مرج السلطان	6	**1**	خوخ	**1**	-



الشكل (9) ▬ المناطق التي وجدت فيها النيماتودا الممرضة للحشرات .

تبين من خلال هذه الدراسة أن العينات الايجابية الحاوية على نيماتودا ممرضة للحشرات كانت عينات مأخوذة من ترب بساتين مزروعة بالتفاحيات واللوزيات، أشجار الحمضيات والجوز وكروم العنب، وكانت أكبر نسبة لوجود النيماتودا هي في الترب المأخوذة من بساتين مزروعة باللوزيات، وكانت نسبة وجودها حوالي 58.8% من النسبة الكلية للنيماتودا الممرضة للحشرات الموجودة في العينات المدروسة، ثم أتى بعد ذلك عينات الترب المأخوذة من البساتين المزروعة بالتفاحيات وكانت نسبة وجود النيماتودا الممرضة للحشرات حوالي 17.6% من النسبة الكلية للنيماتودا الممرضة للحشرات الموجودة في العينات المدروسة، ثم الترب المأخوذة من الحمضيات، وكانت نسبة وجودها حوالي 11.7% من النسبة الكلية للنيماتودا الممرضة للحشرات الموجودة في العينات المدروسة، وأخيرا الترب المأخوذة من كروم العنب والجوز حيث كانت النسبة لكل منها 5.8% الشكل (10). لم يتم العثورعلى النيماتودا الممرضة للحشرات في ترب العينات المأخوذة من الحقول المزروعة بالخضار والمحاصيل النجيلية ومن المروج الخضراء، ومن تحت أشجار الزيتون والحور أيضاً.



الشكل (10) توزع النيماتودا بالنسبة لنوع الأشجار

تختلف النتائج التي تم التوصل إليها إلى حد ما مع نتائج (Canhilal *et al*., 2006) حيث وجدوا في دراستهم لحصر النيماتودا الممرضة للحشرات في مناطق مختلفة من القطر، أن النيماتودا الممرضة للحشرات توجد في حقول المحاصيل (فول– قمح – شوندر سكري....) بنسبة أكبر من وجودها في بساتين العنب والزيتون وأشجار الغابات، وتخالف أيضا النتائج التي تم التوصل إليها في إسبانيا، حيث أشار (Garcia and Palomo , 1996)، أنه لافرق في نسب وجود النيماتودا الممرضة للحشرات في الحقول والبساتين أو الغابات أو المروج. بينت دراسة في مصر أن النيماتودا الممرضة للحشرات تنتشر في بساتين المانجو المتواجد فيها أعشاب برية كثيفة حيث وجد أن الأعشاب البرية ملائمة لنمو وتطور النيماتودا الممرضة للحشرات (Atwa,1999). أشارت الدراسة التي أجريت في نيوجيرسي أن النيماتودا الممرضة للحشرات تتواجد بشكل أكبر في المناطق التي تنتشر فيها الأعشاب الضارة عن مناطق الأعشاب الخضراء، وذلك لأن الأعشاب الضارة تعد بؤرة للحشرات التـــــي تتغذى عليها (Gaugler *et al*.,1994).

تبين بنتيجة التعريف والتحديد وجود الجنسين *Steinernema* والذي تم التعرف عليه من خلال الصفات التالية: وجود فتحة الإطراح قبل الحلقة العصبية لطور العدوى (IJ)، عدم وجود سن واضح في مقدمة الرأس، عدم وجود كيس السفاد عند الذكر، لون يرقة دودة الشمع المصابة كريمي إلى بيج غامق. أما الجنس *Heterorhabditis* فقد تم التعرف عليه من خلال وجود فتحة الإطراح بعد الحلقة العصبية لطور العدوى، وجود سن واضح في مقدمة الرأس عند طور العدوى، وجود كيس السفاد عند الذكر، لون يرقة دودة الشمع المصابة أحمر آجري الشكل (11).

كان عدد العينات الايجابية الحاوية على أحد أجناس النيماتودا الممرضة للحشرات /17/ عينة، احتوت /11/ منها على الجنس *Heterorhabditis* بنسبة 64.70%، واحتوت /6/ منها على الجنس *Steinernema* بنسبة 35.29%، وهذه النتيجة تخالف ما أشار إليه (Canhilal *et al* ., 2006)، الى

وجود الجنس *Heterorhabditis* فقط في مناطق مختلفة من القطر، و تتشابه هذه النتيجة إلى حد ما مع النتيجة التي أشار إليها Hominick وBriscoe (1990)، حيث وجدا أن نسبة وجود الجنس *Steinernema* في العينات الايجابية هو 48.6%، وهي تخالف أيضاً النتيجة التي تم التوصل إليها في كارولينا الشمالية، حيث أشير إلى أن نسبة وجود الجنس *Heterorhabditis* في العينات الايجابية هو 16.9% ونسبة وجود الجنس *Steinernema* هو 2.2% من العينات الايجابية التي تحوي نيماتودا ممرضة للحشرات .(Akhurst and Brooks ,1984)



أعراض الإصابة بالجنس *Heterorhabditis*



أعراض الإصابة بالجنس *Steinernema*

شكل (11) أعراض الإصابة بالنيماتودا الممرضة للحشرات على يرقات دودة الشمع.

التصنيف المورفولوجي للنوع *Heterorhabditis zealandica*:

تم تسجيل النوع *H.zealandica* للمرة الأولى في نيوزيلاندا حيث تم عزله من يرقات الحشرة (*Heteronychus arator*) (Coleoptera : scarabaidae) (Poinar, 1990).

وتشير الدراسات المرجعية إلى أن النوع *H.zealandica* يستخدم بنجاح كبير في مكافحة آفات المروج الخضراء وبخاصة خنافس الديدان البيضاء (Coleoptera:Scarabaeidae)، فقد تم استخدام أربعة أنواع من النيماتودا تابعة للجنس *Heterorhabditis* أحدها النوع *H.zealandica* وذلك بغرض مكافحة يرقات وعذارى الأنواع *Popillia japonica* , *Anomala orientalis,* *Cyclocephala borealis* (Coleoptera:Scarabaeidae) وأظهرت نتائج المكافحة أن النوع *H.zealandica* حقق أعلى نسبة موت لليرقات وصلت إلى 90%، كما أصيبت العذارى بنسبة كبيرة . (Grewal *et al*., 2002)

الوصف المورفولوجي للنوع *H.zealandica* :

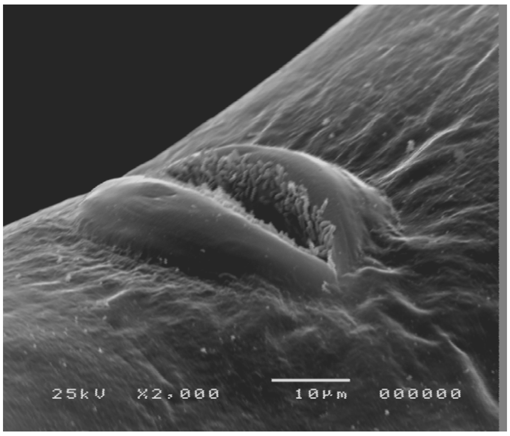
الصفات المورفولوجية المميزة للإناث: الإناث المخنثة (الجيل الأول) لها كيوتيكل أملس، الخطوط الجانبية غير ملاحظة. عند الإناث الصغيرة المنطقة الشفوية مزودة بحليمات شفوية ظاهرة. عند الإناث الكبيرة الشفاه مزودة بأكتاف عريضة محيطة. الحليمات الفموية كبيرة . المري الأمامي له نفس الطول والعرض مع جدر غير حاوية على السكليروتين، يتمدد عند الإناث الكبيرة ليصبح أعرض وأقصر له شكل أنبوبي. المري الأوسط قصير ويضييق عند الحلقة العصبيبة. البصيلة القاعدية هرمية كبيرة ، الصمام واضح. يوجد الثقب الإطراحي عند مستوى البصيلة القاعدية. الأعضاء التناسلية مزدوجة ومعكوسة. حليمات الفتحة التناسلية ناتئة. الشرج واضح. الجسم يعرض قليلاً عند الشرج. الذيل يستدق بسرعة ابتداءً من نصف الذيل الثاني خاصة عند الإناث الثخينة أما عند الإناث الصغيرة فهو يستدق ابتداءً من نصفه الأول نهاية الذيل غالباً مستديرة. الإناث في الجيل الثاني تختلف عن إناث الجيل الأول كبيرة الحجم بما يلي : الحليمات الفموية لا تنتأ بحيث تشكل جيوب واسعة أكتاف عريضة في المنطقة الفموية، الشكل الأنبوبي للمري غائب عند الإناث ، عادة لا يتم وضع بيض، لم تلاحظ النطاف، الفتحة التناسلية أحياناً تفرز المخاط الذي لم يلاحظ في إناث الجيل الأول.

الصفات المورفولوجية المميزة للذكور: الكيوتيكل أملس بدون خطوط جانبية. المنطقة الشفوية كما هي عند الأنثى الفتية. الحوصلة الوسطى بعرض أكبر من نصف عرض الجسم تضيق بشكل واضح عند مستوى الحلقة العصبية، الحويصلة القاعدية بشكل هرمي مع صمام واضح. ثقب الإطراح يقع قبل مستوى قاعدة الحوصلة الوسطى. الجهاز التناسلي شفاف ومنعكس يملأ كامل عرض الجسم في جزئه الأمامي ونصف عرض الجسم في جزئه الخلفي. أشواك السفاد نحيلة مزدوجة. الذيل يستدق كما هو الحال في الأنثى الفتية. الذيل له زوائد غير حادة. كيس السفاده يغلف الذيل ، مزود بتسعة أزواج من الحليمات.

الصفات المورفولوجية المميزة لليرقات المعدية : كونها تعيش بشكل حر فإن اليرقات المعدية غير متغذية وتطورها الداخلي بطيء جداً أو بدون نمو إضافي في طول الجسم والقياسات المورفولوجية تختلف بشكل بسيط لهذا فهي مهمة للتعريف. الجسم نحيل اسطواني، يستدق تدريجياً إبتداءً من قاعدة الحوصلة الوسطى حتى نهاية منطقة الشرج إلى حافة الذيل. الكيوتيكل مزود بالعديد من الخطوط الطولية إبتداءً من الرأس وحتى الذيل. تحزيزات عرضية موجودة بين المنطقة الشفوية ومستوى الثقب الإطراحي. المنطقة الشفوية ملساء. الحوصلة الوسطى طويلة وضيقة، بعرض1/3 إلى 1/4 عرض الجسم، تضيق عند مستوى الحلقة العصبية تنتهي عند صمام حوصلي. الحلقة العصبية واضحة. ثقب الإطراح غير واضح. الزوائد العريضة للنهاية الداخلية للمعي تحتوي على البكتريا، ما تبقى من المعي غير فعال. الذيل مخروطي مع نهايات ضيقة ومستدقة. الفاسميد غير واضح.

تم من خلال دراسة الصفات المورفولوجية السابقة الذكر وأخذ صور بالمجهر الماسح الإلكتروني SEM لبعض الصفات التصنيفية مثل الفتحة التناسلية للأنثى وشوكة الجماع للذكر الشكل(12-13). وأيضاً من خلال أخذ القياسات البيومترية للطور المعدي الثالث وللذكور، تحديد وجود عزلتين من النيماتودا الممرضة للحشرات التابعة للجنس *Heterorhabditis* والتي تم استخلاصها من البيئة المحلية أنها تنتمي إلى النوع *H.zealandica*، هذه العزلات هي MSKH تم الحصول عليها من تربة لوزيات (خوخ) في منطقة مرج السلطان والعزلة الثانية GLA تم الحصول عليها من تربة حمضيات في منطقة أبو جرش، ويظهر الجدول رقم (7) المقاييس البيومترية للطور المعدي الثالث والجدول رقم (8) المقاييس البيومترية للذكر.

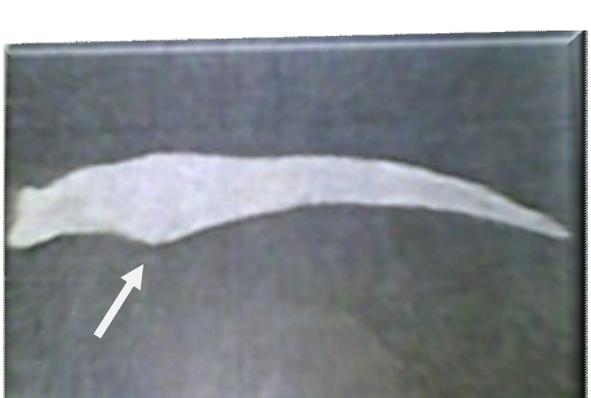
كما تظهر يرقات دودة الشمع عند العدوى بالنوع *H.zealandica* بلون أخضر الشكل (14)





الشكل(12) نمط الفتحة التناسلية (vulva) عند إناث النوع *H.zealandica*.

(صور بالمجهر الالكتروني لإناث العزلة GLA)



الشكل(13) يوضح شوكة الجماع عند الذكور مع الارتفاع البارز للنوع *H.zealandica* .



الشكل (14) أعراض الإصابة بالنوع *H.zealandica*

جدول(7) متوسط المقاييس البيومترية (ميكرومتر) للطورالمعدي الثالث للعزلتين:

MSKH-GLA والتي تنتمي للنوع *H.zealandica*.

المقاييس البيومترية للطور المعدي الثالثIJ	MSKH	GLA	المقاييس المرجعية
طول اليرقة (L)	685 (735-565)	690 (737-567)	(570-740)
أكبر عرض لليرقة (MBW)	27 (29-22)	26 (28-21)	(22-30)
المسافة من المقدمة الأمامية إلى الحلقة العصبية (NR)	100 (106-88)	102 (106-90)	(90-107)
المسافة من المقدمة الأمامية حتى فتحة الإطراح(EP)	112 (123-91)	120 (122-93)	(94-123)
المسافة من المقدمة الأمامية حتى نهاية المريء(ES)	140 (145-132)	138 (144-132)	(135-147)
طول الذيل(T)	102 (118-86)	108 (119-85)	(87-119)
E%	109.80	106.48	
D%	80	83.3	
a	25.37	26.5	
b	4.89	5	
c	6.71	6.38	

جدول(8): متوسط المقاييس البيومترية لذكور العزلتين MSKH-GLA
والتي تنتمي للنوع *H.zealandica*.

المقاييس المرجعية	GLA	MSKH	المقاييس البيومترية للذكور
(48-55)	53 (54-45)	51 (54-46)	طول شوكتي التسافد(SL)
(36-45)	42 (43-33)	41 (44-32)	أقصى عرض(W)
(19-25)	21 (18-22)	22 (19-23)	طول عضو السفاد(GL)
(18-24)	(24-18)23	(21-19)20.7	العرض عند فتحة لإخراج(ABW)
	0.39	0.43	GS

ويبين الجدول (9) نتائج تحليل التربة للعينات الايجابية وبعض العينـات الـسلبية. ويظهـرمن خلال نتائج الجدول (9) أن الجنس *Steinernema* وجد في التربة ذات القوام الرملـي اللـومي وذات القوام الرملي الطيني اللومي وذات القوام الطيني الرملي اللومي، بنسبة 6 :1 :1، ويعود ارتفاع نـسبة وجود الجنس في التربة ذات القوام الرملي اللومي بالمقارنة مع نوعي التربة ذات القوام الرملي الطيني اللومي وذات القوام الطيني الرملي اللومي إلى أن النوع الأول من التربة قليل اللزوجة وبالتالي يـسمح بحركة أفضل لطور العدوى من جهة، ومن جهة أخرى فان النوع الأول مـن التربـة يكـون أغنـى بالأوكسجين. أما الجنس*Heterorhabditis* فوجد في التربة الرملية الطينية اللومية والتربـة الرمليـة اللومية والتربة الرملية الطينية بنسبة 4: 4: 1، وقد أشار Griffin وآخرون 1993 إلـى أن انتـشار الجنس *Heterorhabditis* في مدى واسع من الترب يعود إلى قلة حاجته إلى الأوكسجين مقارنة مـع الجنس *Steinernema*

لم تلاحظ النيماتودا الممرضة للحشرات في التربة ذات القوام الطينـي والتربـة ذات القـوام الطيني اللومي، لأن هذان النوعان من التربة يتسمان بقلة احتوائهما على الأوكسجين، وأيضا في هـذا القوام من الترب تصعب حركة الطور المعدي من النيماتودا الممرضة للحشرات، وهذه النتائج تتوافـق مع (Selcuk *et al*., 2003).

وقد أشار Wallace (1958) أن عدم وجود النيماتودا الممرضة للحشرات بـشكل عـام فـي التربة الطينية يعود الى صغر مسامات التربة الطينة وقلة احتوائها على الأوكسجين، مما يـؤدي الـى انخفاض كفاءة النيماتودا الممرضة للحشرات في تمثيل الغذاء الاحتياطي (Kung *et al*., 1990).

جدول(9): تأثير تركيب التربة من حيث درجة الحموضة ومحتوى المادة العضوية وقوام التربة على انتشار النيماتودا الممرضة للحشرات.

المنطقة	درجة الحموضة	المادة العضوية%	قوام التربة	جنس النيماتودا
جسر الغيضة	7.11	2.5	رملية لومية	*Heterorhabditis*
جسر الغيضة	7.51	2.5	رملية لومية	*Heterorhabditis*
النشابية	7.23	5.9	طينية رملية لومية	*Steinernema*
عسال الورد	7.22	4.9	طينية رملية لومية	*Heterorhabditis*
رنكوس	7.41	4.3	رملية لومية	*Steinernema*
رنكوس	7.11	3.5	رملية لومية	*Steinernema*
حينة	7.00	6.9	رملية لومية	*Heterorhabditis*
سهل رنكوس	7.69	2.2	رملية لومية	*Steinernema*
حوش عرب	7.31	3.9	رملية طينية لومية	*Heterorhabditis*
حوش عرب	7.52	4.5	رملية طينية لومية	*Heterorhabditis*
مرج السلطان	7.21	2.9	رملية لومية	*Heterorhabditis*
بيت جن	7.23	3.9	رملية لومية	*Heterorhabditis*
بيت جن	7.14	4.2	رملية لومية	*Steinernema*
أبو جرش	7.51	6.8	رملية لومية	*Steinernema*
أبو جرش	7.53	4.3	رملية طينية لومية	*Heterorhabditis*
حران العواميد	7.39	3.1	رملية لومية	*Steinernema*
عسال الورد	6.91	2.7	رملية لومية	لايوجد
بيت جن	7.14	2.6	رملية لومية	لايوجد
جسر الغيضة	6.81	5.1	طينية لومية	لايوجد
عربين	6.45	3.1	طينية رملية لومية	لايوجد
بيت سابر	7.25	1.2	طينية	لايوجد
خرابو	7.92	2	رملية طينية	*Heterorhabditis*

أما من حيث محتوى التربة من المادة العضوية، فلم تظهر نتائج البحث أي ارتباط بين محتوى التربة من المادة العضوية وانتشار النيماتودا الممرضة للحشرات، ونتيجة التحليل الإحصائي تبين أن الفروقات ظاهرية وغير معنوية في نسبة المادة العضوية في الترب المختلفة على مستوى 5% و 1%.

ولم تظهر النتائج أي ارتباط بين درجة حموضة التربة pH وانتشار النيماتودا الممرضة للحشرات.

ونلاحظ من الجدول (9) أن الجنس *Steinernema* انتشر في الترب التي تراوح محتوى المادة العضوية فيها بين 2.2 و 6.8%، وتراوحت نسبة المادة العضوية في التربة ذات القوام اللومي التي انتشر فيها الجنس *Steinernema* ما بين 2.2 و 4.2%، بينما كانت نسبة المادة العضوية في التربة ذات القوام الرملي الطيني اللومي 6.8% وفي التربة ذات القوام الطيني الرملي اللومي 5.9%.

أما الجنس *Heterorhabditis*، فانتشر في الترب التي تراوحت فيها نسبة المادة العضوية بين 2 و4.9%. وكانت أعلى نسبة للمادة العضوية في التربة ذات القوام الرملي الطيني اللومي، وكانت أقل كمية للمادة العضوية في التربة ذات القوام الرملي الطيني، وأشارت بعض الدراسات أن نسبة المادة العضوية المناسبة لانتشار النيماتودا الممرضة للحشرات تتراوح بين 1%إلى2% .(Selcuk *et al* ; 2003 , Barbercheck and Kaya, 1975)

وبالنسبة لدرجة الحموضة (pH) نلاحظ من الجدول (9) أن النوعان انتشرا في الترب التي تراوحت فيها درجة الحموضة بين 7 و 7.92، وبصورة عامة فان قيمة الأس الهيدروجينيpH الملائمة لوجود وانتشار النيماتودا الممرضة للحشرات تتراوح بين 4.6 و8 (Canhilal *et al*., 2006) بينت الدراسات المختلفة أن نسبة العينات الايجابية الحاوية على نيماتودا ممرضة للحشرات ترتبط بعدة عوامل منها: حجم العينة، تاريخ الجمع، نوع التربة، الظروف البيئية، العائل النباتي والعائل الحشري (Akhurst and Bedding,1986; Hominick and Briscoe, 1990 ; Stuart and Gaugler,1994)

3-2-اختبار تأثير درجات الحرارة المختلفة على الفاعلية الإمراضــية لــبعض العــزلات المحليــة للنيماتودا الممرضة للحشرات:

تم دراسة الفاعلية الإمراضية لست عزلات من النيماتودا المستخلصة من تربة حقول وبساتين محافظة ريف دمشق على يرقات في العمر الاخير لدودة الشمع *Galleria mellonella* تحت درجات حرارة مختلفة (15-20-25-30مْ)، حيث كانت 3 عزلات منها تنتمي للجنس *Heterorhabditis* و 3 عزلات تنتمي للجنس *Steinernema* واستخدمت هذه العزلات بتركيز 250 فرد/مل. تم تحديد الفاعلية من خلال معرفة معدل الموت ومعدل التكاثر بإحصاء أعداد أفراد الطور اليرقي الثالث الخارجة من يرقات دودة الشمع بالنسبة لكل عزلة تحت درجات الحرارة المختلفة.

3-2-1 معدل الموت ليرقات دودة الشمع عند استخدام عزلات مختلفة من النيماتودا تحت درجات حرارة مختلفة:

- الدرجة 15مْ: حققت العزلة RTA من الجنس (*Steinernema*) أعلى نسبة للموت ومتوسطها **64.00%** وكانت أكثر تأقلماً مع درجات الحرارة المنخفضة وتفوقت معنوياً على باقي العزلات عند هذه الدرجة، بينما حققت العزلة RM من الجنس (*Steinernema*) معدل موت متوسطه 60.67%، أما العزلة RST والتي تنتمي لنفس الجنس السابق فقد بلغ متوسط نسبة الموت 41.67%، في حين كان متوسط معدل الموت الذي حققته العزلة JKH من الجنس (*Heterorhabditis*) 21.67%، بلغ متوسط نسبة الموت عند العزلة MHA (*Heterorhabditis*) 17.00%، في حين بلغ أقل متوسط للموت 1.00% وذلك عند العزلة PHA من الجنس (*Heterorhabditis*).
- الدرجة 20مْ : حققت العزلة RM (*Steinernema*) أعلى نسبة موت متوسطها 99.33% وتفوقت معنوياً على باقي العزلات، تأتي في المرتبة الثانية العزلتين RTA–RST من الجنس (*Steinernema*) حيث بلغ متوسط معدل الموت عند هذه الدرجة من الحرارة 72.00-73.00% على التوالي، أما العزلتين MHA-JKH (*Heterorhabditis*) فقد كانت نسبة الموت 63.00 - 65.67%، في حين بلغت نسبة الموت عند العزلة PHA (*Heterorhabditis*) وكانت هناك فروق معنوية بين العزلات الجدول رقم(10).

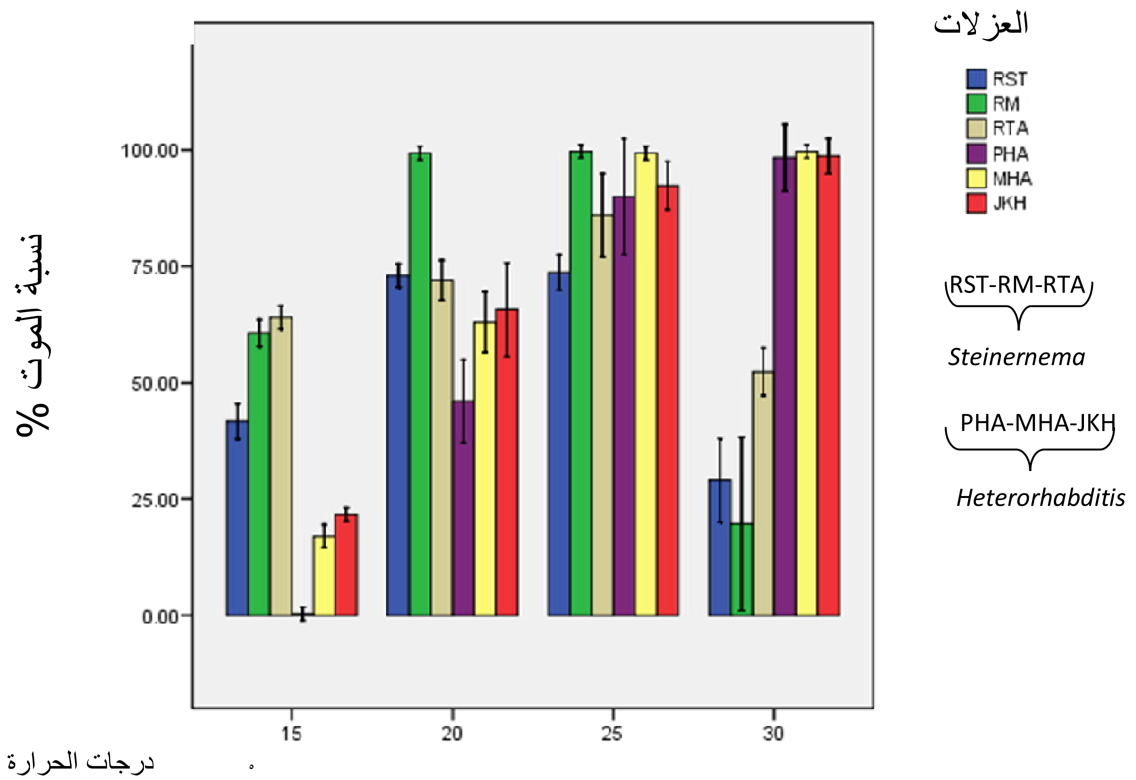
جدول(10): متوسط النسبة المئوية للموت عند تطبيق عزلات مختلفة من النيماتودا على يرقات دودة الشمع *Galleria mellonella* تحت درجات حرارة مختلفة

العزلات	متوسط نسبة الموت %			
	درجات الحرارة			
	15 مْ	20 مْ	25 مْ	30مْ
Steinernema RST	c 41.67	b 73.00	d 73.67	c 29.00
Steinernema RM	b 60.67	a 99.33	a 99.67	d 19.67
Steinernema RTA	a 64.00	b 72.00	c 86.00	b 52.33
Heterorhabditis PHA	f 1.00	d 46.00	bc 90.00	a 98.33
Heterorhabditis MHA	e 17.00	c 63.00	a 99.33	a 99.67
Heterorhabditis JKH	d 21.67	c 65.67	b 92.33	a 98.67

* القيم المتبوعة بأحرف مختلفة يوجد بينها فروق معنوية عند مستوى معنوية 0.05 ، وذلك بين العزلات عند كل درجة حرارة.

_ الدرجة 25مْ: حققت العزلة RM (*Steinernema*) والعزلة MHA (*Heterorhabditis*) أعلى معدل للموت ومتوسطه على التوالي 99.33 – 99.67 % وتفوقت هاتان العزلتان معنوياً على باقي العزلات، في حين بلغت نسبة الموت عند العزلتين JKH – PHA (*Heterorhabditis*) 90.00 – 92.33 % ، وكان متوسط نسبة الموت 86.00 % عند العزلة RTA (*Steinernema*) ، في حين حققت العزلة RST (*Steinernema*) أقل معدل للموت ومتوسطه 73.67 % .

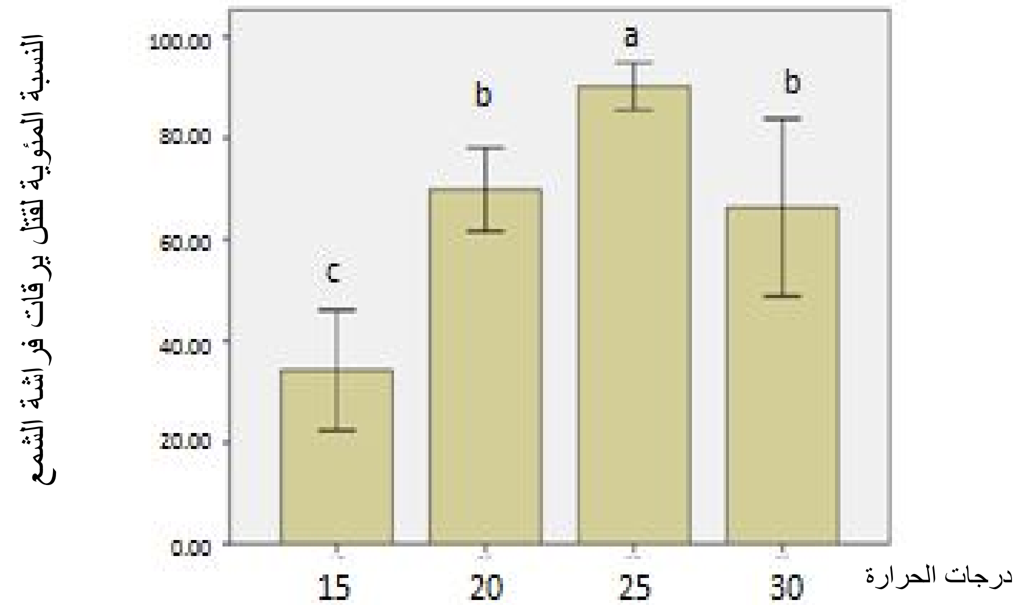
_ الدرجة 30مْ : تفوقت عند هذه الدرجة من الحرارة العزلات التابعة للجنس (*Heterorhabditis*) معنوياً على العزلات التابعة للجنس (*Steinernema*) حيث بلغت نسبة الموت عند العزلات PHA MHA – JKH– (*Heterorhabditis*) على التوالي 98.33-98.67-99.67 % ولم تظهر نتائج التحليل الإحصائي أي فروق معنوية بين هذه العزلات الثلاث عند هذه الدرجة من الحرارة ، في حين بلغت نسبة الموت عند العزلات RM-RST-RTA من الجنس (*Heterorhabditis*) على التوالي 52.00-29.00-19.67 % وكانت هناك فروق معنوية بين هذه العزلات الشكل (15).



الشكل (15) تأثير درجات الحرارة على النسبة المئوية للموت عند تطبيق عزلات مختلفة من النيماتودا على يرقات دودة الشمع *Galleria mellonella*

وتظهر نتائج التحليل الإحصائي تفوق درجة الحرارة 25مْ معنوياً على باقي درجات الحـــرارة من حيث معدل القتل، ويظهر الشكل (16) تأثير درجات الحرارة في النسبة المئوية لقتل يرقـــات دودة الشمع.

تتوافق هذه النتائج مع ما توصل إليه Kung and Kaya عام 1991 وهو أن المدى الحراري لنشاط النيماتودا ضيق والقدرة على إحداث العدوى والموت تقل بشكل ملحوظ عند درجة الحرارة المرتفعة والمنخفضة، ولما كانت الحرارة هي العامل الأهم الذي يؤثر على تطبيقات النيماتودا في مناطق مناخية مختلفة سواء سلباً أو ايجاباً فقد اقتضى الأمر أن تكون أفضل عزلات النيماتودا تلك التي تملك مجال حراري واسع وتتأقلم نوعاً ما مع كل درجات الحرارة، كما إن تطور القدرة على الإصابة عندالنيماتودا ومدى توسع حدود الإصابة يعود بشكل كامل أو جزئي لتطور مستوى نمو البكتريا المتعايشة *Photorhabdus – Xenorhabdus* (Grewal *et al*., 1993a)



* القيم المتبوعة بأحرف مختلفة يوجد بينها فروق معنوية عند مستوى معنوية 0.05

الشكل (16) تأثير درجات الحرارة في النسبة المئوية لقتل يرقات فراشة الشمع

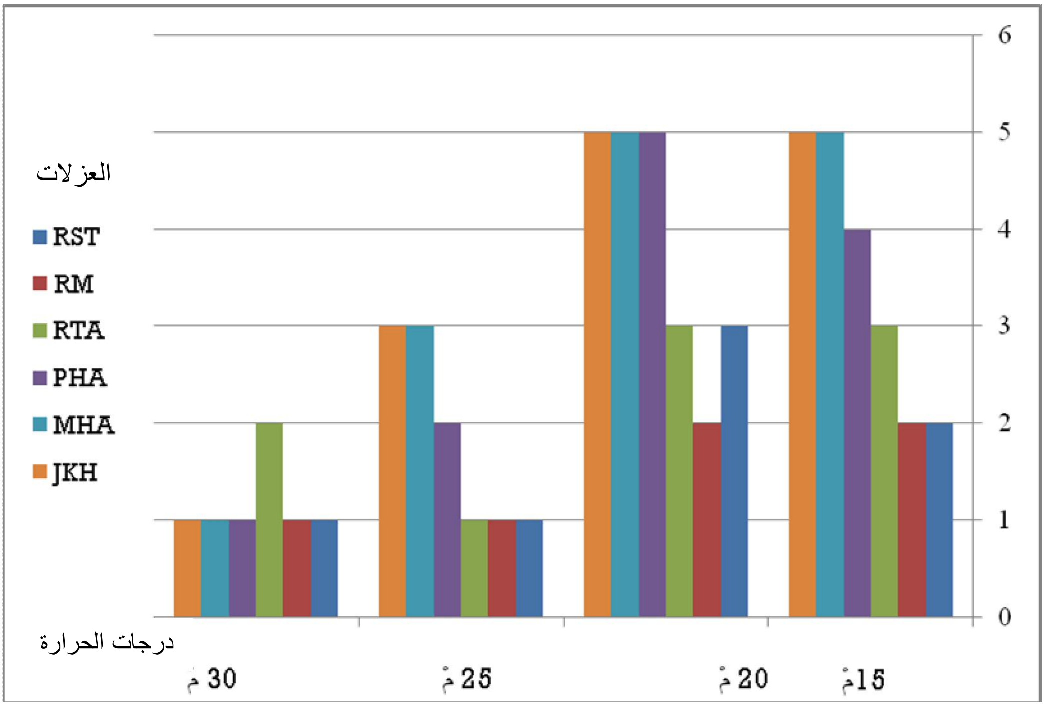
فالحرارة تؤثر بشكل مباشر في مستوى تكاثر البكتريا المتعايشة وحيوية النيماتودا وقدرتها على الإصابـــة حيث أثبت Milstead (1981) أن تطور البكتريا *Photorhabdus* تم تثبيطه عند الحرارة 12 مْ، وهذه النتائج تتشابه إلى حد ما مع النتائج التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة، وإن حدوث الموت عند العائل مرتبط بمقدار استجابة هذا العائل للجرعة البكتيرية الواصلة إلى أنسجته وهذه الجرعة تزداد وتنقص مع معدل التكاثر البكتيري وهذا الأخير متلازم تماماً مع درجات الحرارة، وعليه فإن دراسة القدرة الإمراضية للنيماتودا تتطلب بالتزامن معها دراسة إمراضية المتلازمة بكتريا _ نيماتودا ممرضة للحشرات، كما أن الحرارة تؤثر على حركة النيماتودا باتجاه العائل واختراقها لجسمه من خلال فتحات الجسم الطبيعية (Byers and Poinar,1981)

وذكر Stiener 1996 أن فشل *S.feltiae* في إمراضيتها ليرقات *G.mellonella* يعود إلى قدرتها الضعيفة على الحركة عند درجة الحرارة 6مْ، لذلك عند تطبيق النيماتودا حقلياً لابد أن تؤخذ مواصفات المنطقة الحرارية بعين الإعتبار وبالتالي اختيار عزلة النيماتودا المتوافقة حرارياً مع هذه المنطقة، وفي هذه الدراسة تبين أن العزلات التابعة للجنس *Steinernema* قد تفوقت معنوياً على باقي العزلات من الجنس *Heterorhabditis* على درجة الحرارة 15مْ الشكل (15) فهذه العزلات تكون فعالة ضد الحشرات النشيطة في الفصول الباردة فهي متأقلمة أكثر مع درجات الحرارة الباردة وهذا يتفق مع ماوجده كثيرون، وهو أن النيماتودا التابعة للجنس *Steinernem* منتشرة بصورة كبيرة في

المناطق المعتدلة والباردة مثل بريطانيا(Hominick and Brisco,1990)، وألمانيا (Ehlers *et al* .,1991)، وإيرلندا (Griffen *et al*.,1991)، وسكوتلاندا (Boag *et al.,*1992)، والنروج (Haukeland,1993). في حين أن العزلات التابعة للجنس *Heterorhabditis* تفوقت معنوياً على العزلات التابعة للجنس*Steinernema* عند درجة الحرارة 30 مْ فيمكن استخدامها ضد الحشرات التي تنشط في الصيف فهي متاقلمة أكثر مع درجات الحرارة العالية وهذا يتفق مع ما وجده Jaworaska (1992) وهو أن النيماتودا من الجنس *Heterorhabditis* متكيفة مع الأجواء الحارة وهي شائعة الوجود في المناطق المدارية وشبه المدارية مثل استراليا (Akhurst and Bedding,1986)، وهاواي (Akhurst and Booker, 1984)، ومصر (Shamseldean and Abd Elgawad,1994).

3-2-2-الوقت اللازم لقتل 50% من يرقات دودة الشمع عند درجات حرارة مختلفة:

اختلفت المدة اللازمة لقتل50% من العائل الحشري (يرقات دودة الشمع) باختلاف العزلة المستخدمة وباختلاف درجة الحرارة، فعند الدرجة 15مْ استغرقت العزلات التابعة للجنس *Steinernema* وقت قصير لإحداث العدوى والموت (48 ساعة) في حين تأخرت عزلات الجنس *Heterorhabditis* في إحداث القتل عند هذه الدرجة من الحرارة ووصلت إلى 5أيام أما عند الدرجة 20مْ فكانت العزلات من الجنس *Steinernema* أسرع في القتل حيث احتاجت إلى 3أيام بينما احتاجت عزلات الجنس*Heterorhabditis* إلى 5أيام، وعند درجة الحرارة 25مْ كانت الفترة اللازمة للقتل يوم واحد فقط بانسبة لجنس *Steinernema* ، وظهرت أعراض الإصابة والموت على اليرقات المعدية بالجنس*Heterorhabditis* بعد2-3 يوم، أما بالنسبة لدرجة الحرارة 30مْ فكان الوقت اللازم للقتل أقل مايمكن عند كل العزلات ومن الجنسين، حيث ظهرت أعراض الإصابة والموت بعد 24 ساعة من العدوى ويوضح الشكل (17) الفترات اللازمة لقتل 50 % من يرقات دودة الشمع.



الشكل (17): الفترة اللازمة لقتل 50% من يرقات دودة الشمع (بالأيام)
باستخدام عزلات نيماتودا مختلفة على درجات حرارة مختلفة

وهذا يتوافق مع مأأكده Poinar 1990 حول تأثير زيادة درجة الحرارة في انخفاض فترة التحضين أو الفترة اللازمة لقتل العائل الحشري، وإن البكتريا هي التي تحول العائل الحشري إلى بيئة مناسبة لتطور وإنتاج النيماتودا داخل هذا العائل.

هذه النتائج تشير إلى أن الحرارة عامل هام يؤثر في سلوك ونشاط النيماتودا سواء من الجنس *Steinernema*أو الجنس*Heterorhabditis* وتفسير هذه النتائج يتوافق مع ما وجده الكثير من الباحثين في هذا المجال ، فقد أوضح Glazer وآخرون عام 1996 أن السرعة الأكبر في موت العائل الحشري المعدي والسمية الاكبر في سلالات النيماتودا قد يكون ناتج عن تضافر عدة عوامل منها: معدل سرعة الإختراق، معدل تكاثر أكبر للنيماتودا، سرعة تكاثر البكتريا المعايشة، وهذه العوامل كلها تتعلق بدرجة الحرارة.

كما أشار Gray وWebester (1986) إلى أن السلوك المختلف لسلالات النيماتودا ترجع إلى الإختلاف في طرق البحث عن العائل، القدرة على الإختراق، الإختلاف في أنواع التوكسينات المفرزة من قبل المعقد نيماتودا –بكتريا، أيضاً للقدرة الإمراضية للبكتريا نفسها وعدد خلايا البكتريا في الفرد النيماتودي الواحد.

كما توصل Grewal وآخرون (1993b) إلى أن التطور في مقدرة النيماتودا على العدوى في مدى حراري معين وظهور أعراض الإصابة يرجع بشكل كلي أو جزئي إلى التطور في معدل نمو البكتريا المتعايشة.

3-2-3-الفترة اللازمة لخروج الأطوارالمعدية للنيماتودا من يرقات دودة الشمع المصابة تحت درجات حرارة مختلفة:

تم خروج الطور المعدي الثالث للنيماتودا من يرقات دودة الشمع في أوقات مختلفة، باختلاف العزلة ودرجة الحرارة

_ الدرجة 15مْ : كان أسرع خروج للأطوار المعدية عند هذه الدرجة للعزلات التابعة للجنس (*Steinernema*) حيث خرجت الأطوار المعدية من العزلات RTA-RST-RM بعد فترات متوسطها على التوالي 7.00-9.67 -10.00 يوم من حدوث الإصابة، أما العزلة PHA (*Heterorhabditis*)خرجت الأطوار المعدية بعد 28.33 يوم من حدوث الإصابة، في حين أن العزلتين MHA-JKH بقيت داخل العائل الحشري أطول فترة من بين العزلات عند هذه الدرجة من الحرارة حيث بلغت هذه الفترة نحو 36.33 - 35.00 يوم على التوالي الجدول (11).

تأثير درجات الحرارة في الفترة اللازمة لخروج الأطوار المعدية من يرقات فراشة الشمع. **جدول رقم (11)**

العزلات	درجات الحرارة							
	30 مْ		25 مْ		20 مْ		15 مْ	
Steinernema RST	0	c	7.33	ab	14.67	c	9.67	c
Steinernema RM	17.33	a	7.33	ab	18.00	b	7.00	c
Steinernema RTA	20.00	a	7.67	ab	14.00	c	10.00	c
Heterorhabditis PHA	11.67	b	6.33	b	22.67	a	28.33	b
Heterorhabditis MHA	11.00	b	9.00	a	23.33	a	35.00	a
Heterorhabditis JKH	11.67	b	9.33	a	19.33	b	36.33	a

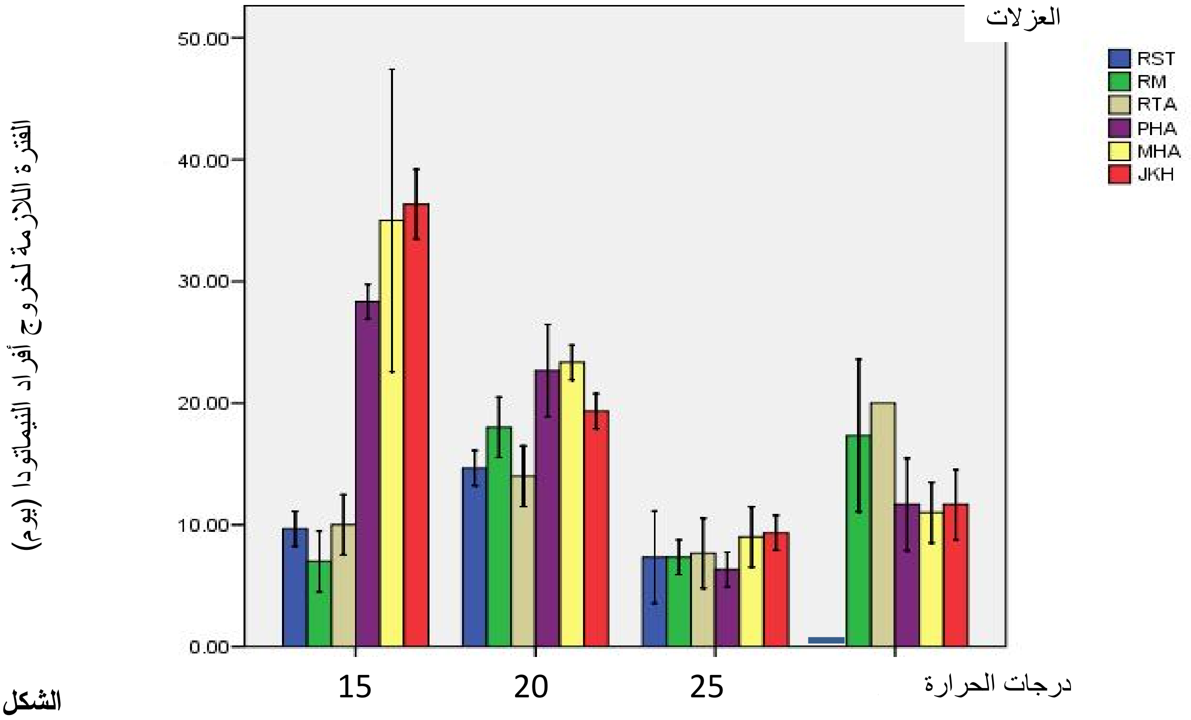
* القيم المتبوعة بأحرف مختلفة يوجد بينها فروق معنوية عند مستوى معنوية 0.05 وذلك ضمن درجة الحرارة الواحدة .

_ الدرجة 20مْ : كان خروج الأفراد المعدية عند العزلتين RST-RTA (*Steinernema*) بعد فترة بلغ متوسطها 14.00 – 14.67 يوم وهي أقصر فترة عند هذه الدرجة من الحرارة، أما العزلتين RM (*Steinernema*) – JKH (*Heterorhabditis*) فقد خرجت الأفراد المعدية بعد 18.00–19.33 يوم من الإصابة، في حين أن العزلتين MHA-PHA من الجنس (*Heterorhabditis*) خرجت الأفراد عندها بعد أطول فترة ومتوسطها 22.66 – 23.33 يوم من الإصابة.

ـ الدرجة 25مْ: كانت أفضل درجة حرارة بالنسبة لجميع العزلات حيث خرجت أفراد النيماتودا بالنسبة للعزلات PHA (*Heterorhabditis*)-RTA-RM-RST (*Steinernema*) بعد فترات من الإصابة متوسطها 6.33 – 7.33 – 7.33–7.67 يوم تليها العزلات JKH-MHA (*Heterorhabditis*) حيث خرجت الأفراد المعدية بعد 9.00 – 9.33 يوم.

ـ الدرجة 30مْ خرجت الأطوار المعدية عند هذه الدرجة بعد فترات مختلفة ، أقصرها عند العزلات التي تنتمي للجنس (*Heterorhabditis*) حيث خرجت بعد 11.00 – 11.67 -11.67 يوم وذلك بالنسبة للعزلات JKH – PHA - MHA، أما عند عزلات الجنس (*Steinernema*) فلم تخرج الأفراد نهائياً عند العزلة RST في حين خرجت بعد 17.33يوم من الإصابة بالنسبة للعزلة RM، وبعد 20.00 يوم بالنسبة للعزلة RTA وهذا موضح في الشكل (18).

تفسر هذه النتائج ميكانيكيات البقاء عند النيماتودا الممرضة للحشرات والتي تستخدمها للمحافظة على استمرارية وجودها وتأقلمها مع درجات الحرارة المختلفة والظروف الجوية المناسبة ومن هذه الميكانيكيات بقاء النيماتودا بحالة ساكنة في التربة أو هجرتها للأسفل لتجنب الظروف غير الملائمة (Kaya , 1990)، وقد تقوم النيماتودا بتقليل مستوى الاستقلاب ومتطلبات الأوكسيجين، أو تقوم بتركيب مواد كيميائية تمنع التجمد في حالة الظروف الجوية الباردة، وقد تبقى أفراد النيماتودا في جثة العائل لفترة طويلة لتجنب الظروف غير الملائمة خارج العائل (Gaugler *et al*., 1997) وهذا يتوافق مع نتائج هذا البحث.



الشكل (18): تأثير درجة الحرارة في الفترة اللازمة لخروج الأطوار المعدية من يرقات فراشة الشمع

وإن عدم خروج الأطوار المعدية للنيماتودا من يرقات دودة الشمع عند درجة الحرارة 30مْ بالنسبة للعزلة RST (*Steinernema*) بالرغم من إصابتها لليرقات وحدوث الموت وهذا يعني عدم تأقلم هذه العزلة مع هذه الدرجة من الحرارة وهذا ما أكده Gaugler وآخرون عام 1997 أن عدم توفر الظروف الملائمة حرارياً خارج العائل تؤدي إلى عدم خروج أفراد النيماتودا من العائل وهذا مايفسر عدم وجود أي يرقة من النيماتودا *S.carpocapsae* في الجثث المصابة بشدة من دودة الشمع تحت درجات حرارة معينة.

أما بالنسبة للفترة التي استمرت فيها هذه الأفراد بالخروج من جثث دودة الشمع فقد لوحظ أن هذه الفترة تطول عندما تكون درجة الحرارة خارج العائل غير ملائمة لعزلة النيماتودا فعند الدرجة 15مْ كان متوسط هذه الفترات(يوم) بالنسبة للعزلات التابعة للجنس *Steinernema* 51.66 - 55.00 – 46.66 للعزلات RST-RM-RTA في حين أن العزلات التابعة للجنس *Heterorhabditis* كان متوسط هذه الفترات 75.00 – 76.66 – 78.33 يوم للعزلات PHA-JKH-MHA .

الدرجة 20مْ : كانت تتراوح متوسطات هذه الفترة بين 25.00 – 53.33 يوم أقلها للعزلات التابعة للجنس *Steinernema* وأكثرها للعزلات التابعة للجنس *Heterorhabditis* .

الدرجة 25مْ : استمرت أفراد النيماتودا بالخروج لفترة متوسطها 19.33 يوم وذلك بالنسبة للعزلة RTA من الجنس *Steinernema* وهي أقل فترة ، أما أطولها فكانت للعزلة JKH من الجنس *Heterorhabditis* حيث بلغت 38.33 يوماً الجدول (12).

الدرجة 30مْ : خرجت جميع الأفراد المعدية بالنسبة للعزلتين RM-RTA التابعة للجنس *Steinernema* في وقت قصير وكانت أعدادها قليلة جداً وحيويتها قليلة، أما بالنسبة للعزلة RST التابعة لنفس الجنس السابق فلم تخرج أفراد النيماتودا أبداً ، في حين أن خروج أفراد النيماتودا كان منتظماً أكثر وبفترة زمنية تراوحت بين 19 – 35 يوم للعزلات التابعة للجنس *Heterorhabditis* وهذا موضح في الجدول (12).

جدول (12): الفترة التي استمرت فيها الأطوار المعدية للنيماتودا بالخروج من يرقات فراشة الشمع تحت درجات حرارة مختلفة (الفترة الزمنية باليوم)

العزلات		درجات الحرارة							
		30		25		20		15	
Steinernema	RST	_	d	25.67	b	28.33	b	55.00	b
Steinernema	RM	3.33	c	23.33	bc	30.00	b	51.67	b
Steinernema	RTA	2.67	c	19.33	c	25.00	b	46.67	b
Heterorhabditis	PHA	35.00	a	33.33	d	46.67	a	78.33	a
Heterorhabditis	MHA	21.00	b	36.67	a	53.33	a	75.00	a
Heterorhabditis	JKH	19.00	b	38.33	a	52.67	a	76.67	a

*** القيم المتبوعة بأحرف مختلفة يوجد بينها فروق معنوية عند مستوى معنوية 0.05 وذلك ضمن درجة الحرارة الواحدة**

3-2-4-تأثير درجات الحرارة المختلفة في كثافة أفراد الطور المعدي الخارجة من يرقات دودة الشمع المعدية بعزلات مختلفة من النيماتودا:

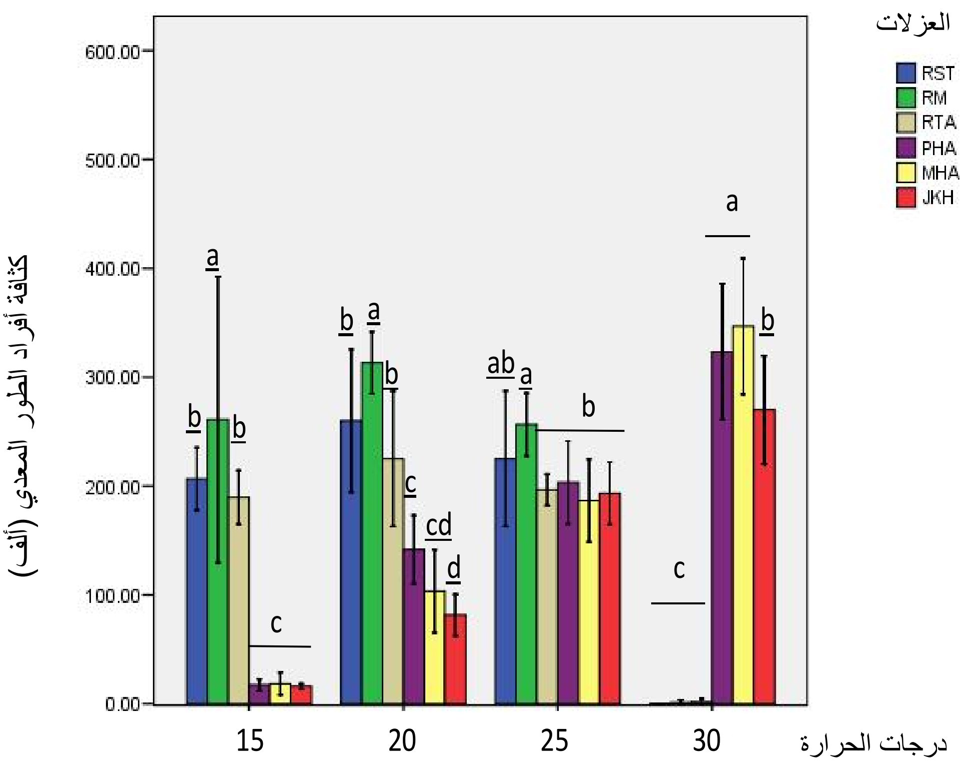
مايهمنا عند التعامل مع النيماتودا الممرضة للحشرات ليس فقط قتل العائل وإنما ماينتج عن هذا العائل من أفراد نيماتودا جديدة تكون بمثابة مبيد مستمر في التربة.

الدرجة 15مْ : أنتجت العزلة RM (*Steinernema*) عند هذه الدرجة أكبر كثافة عددية للطور المعدي بلغ متوسها 216.00 ألف طور معدي من اليرقة وتفوقت معنوياً على باقي العزلات، في حين بلغ متوسط ماأنتجته العزلتان RST-RTA (*Steinernema*) 206.66-189.66 ألف طور معدي على التوالي، في حين انخفضت الكثافة عند العزلات التابعة للجنس *Heterorhabditis* عند هذه الدرجة وكان متوسط انتاجها من النيماتودا 16.00 – 17.33 – 18.33 ألف طور معدي للعزلات -MHA PHA-JKH .

الدرجة 20مْ : بلغ أعلى متوسط لكثافة أفراد الطور المعدي 313.33 ألف طور معدي وذلك للعزلة RM (*Steinernema*) وتفوقت معنوياً على باقي العزلات، في حين بلغ متوسط هذا العدد 260.00 – 225.00 ألف للعزلتين RST – RTA (*Steinernema*)، أما العزلات التابعة للجنس *Heterorhabditis* فبلغ متوسط ما أنتجته من نيماتودا 141.66 ألف طور معدي للعزلة PHA و103.33 ألف للعزلة MHA في حين أن أقل كثافة عند هذه الدرجة من الحرارة كانت للعزلة JKH حيث بلغت 81.66 ألف طور معدي.

الدرجة 25مْ : بلغ أكبر متوسط لكثافة أفراد الطور المعدي 225.00 – 256.66 ألف وذلك للعزلتين RST-RM على التوالي وتفوقت هاتان العزلتان معنوياً على باقي العزلات، في حين بلغ متوسط كثافة الأطوار المعدية 186.00 – 193.33 – 196.66 ألف للعزلات MHA- JKH-PHA من الجنس *Heterorhabditis* و 203.33 ألف للعزلة RST للجنس *Steinernema*.

الدرجة 30مْ : بلغت أكبر كثافة للطور المعدي عند العزلتان MHA-PHA وكانت تساوي 323.33 – 346.66 ألف وتفوقت معنوياً على باقي العزلات المستخدمة، أما العزلة JKH فكان متوسط ما أنتجته 270.00 ألف طور معدي، بينما أنتجت العزلات التابعة للجنس *Steinernema* أعداد قليلة من أفراد النيماتودا بلغ متوسطها 1.00 – 1.66 ألف طور معدي وذلك بالنسبة للعزلات RTA-RM ولم تعط العزلة RST أي فرد من النيماتودا وهذا موضح في الشكل (19).



* القيم المتبوعة بأحرف مختلفة يوجد بينها فروق معنوية عند مستوى معنوية 0.05 وذلك ضمن درجة الحرارة الواحدة

الشكل (19) معدل التكاثر عند عزلات النيماتودا تحت درجات حرارة مختلفة .

هذه النتائج تشير إلى أن المعدل الحراري المثالي لمعدل التكاثر يتراوح بين 25–30مْ بالنسبة لعزلات الجنس *Heterorhabditis*، ويتراوح بين 15–25مْ بالنسبة لعزلات الجنس *Steinernema*، فمعدل التكاثر انخفض بشدة عند درجة الحرارة 30مْ بالنسبة لهذا الجنس الأخير، والتعرض لهذه الدرجة من الحرارة أدى إلى إنتاج أعداد قليلة من النيماتودا بالنسبة للعزلتين RTA،RM في حين أن العزلة RST لم تعطي أي فرد من النيماتودا عند التعرض لهذه الدرجة من الحرارة وعند تشريح يرقات دودة الشمع المعدية بهذه العزلة لم نجد أي فرد نيماتودي لذلك يمكن القول أن الدرجة 30مْ هي نقطة الموت الحراري لهذه العزلة، الشكل (19). وإن قدرة النيماتودا على إنتاج أفراد معدية يرتبط بدرجة الحرارة والتي تؤثر على معدل التكاثر عند أفراد النيماتودا ومعدل نمو البكتريا داخلها (Milstead , 1981 ; Wright , 1992).

كما أكد Grewal (1994) على أن النيماتودا الممرضة للحشرات لها مؤشر حراري واضح قد لاتصبح خارج هذا المدى أو المؤشر فعالة، وهذا الاختلاف الذي تم الحصول عليه في أعداد أفراد النيماتودا الناتجة عن يرقات دودة الشمع يوضح أن لكل عزلة من هذه العزلات مؤشر ومدى حراري خاص بها يجب أن تستخدم ضمنه وهذا ماأشار إليه الكثيرون ممن يبحثون في هذا المجال (Downes, 1991; Kung *et al*., 1991; Wright, 1992 ; Grewal *et al*., 1993; Shamseldean , 1994) حيث سجل هؤلاء أن هناك اختلاف وتنوع واسع في قدرة أنواع وسلالات النيماتودا على الفتك بالعائل وانتاج أفراد جديدة عند درجات حرارة مختلفة.

وإن الأعداد القليلة لبعض العزلات عند درجات حرارة معينة تفسر بفقدان سلوك معين للنيماتودا أو فقدان حيوية البيوض أو النطاف أو بسبب سلوك التزاوج للنيماتودا ، أو أنه متعلق بفقدان سلالات من البكتريا المتعايشة متكيفة مع هذه الدرجات من الحرارة (Dutky et al ., 1964 ; Kaya , 1977 ; Wright , 1992).

تشير النتائج التي توصلنا إليها من خلال هذا البحث إلى أن النيماتودا التابعة للجنس *Steinernema* تفضل الأجواء الباردة والمعتدلة وتستطيع التأقلم مع الظروف الحرارية الباردة، أما النيماتودا التابعة للجنس *Heterorhabditis* فهي تفضل الأجواء الحارة وتتأقلم معها، وهذا يتوافق مع ما وجده وأثبته Hominick وآخرون (1995) أن النيماتودا التابعة للجنس *Steinernema* تتواجد في المناطق الباردة والمعتدلة في حين أن النيماتودا التابعة للجنس *Heterorhabditis* فهي متأقلمة مع الظروف الجوية الحارة وتحتاج إلى درجات حرارة أعلى من *Steinernema* .

أيضاً تتوافق هذه النتائج مع ماوجده Shamseldean و Abd-Elgawad (1994) في عملية الحصر للنيماتودا الممرضة للحشرات في مصر وهو وجود الجنس *Heterorhabditis* كان متوفراً أكثر في الأشهر الحارة منها في الأشهر الباردة.إن نتائج هذه الدراسة تبرهن أن درجة الحرارة هي أهم العوامل التي تؤثر في عمل النيماتودا الممرضة للحشرات فهي تؤثر على العدوى، معدل التكاثر.

3-3-التقييم الحيوي للتربية الإنتاجية لبعض عزلات النيماتودا الممرضة للحشرات والمستخلصة من ترب ريف دمشق على يرقات فراشة الطحين

(*Ephestia kuehniella Zell*)(Pyralidae : Lepidoptera):

تم استخدام بعض العزلات المستخلصة من ترب مناطق مختلفة في محافظة ريف دمشق وهي: العزلة RST من الجنس *Steinernema* والعزلات VH-PHA-DKH من الجنس *Heterorhabditis*،ويوضح الشكل (20) أعراض الإصابة بالنيماتودا على يرقات فراشة الطحين. تم تطبيق خمسة تراكيز من كل عزلة 50-100-250-500-1000 فرد معدي/مل.



الشكل (20) أعراض الإصابة بالنيماتودا الممرضة للحشرات على يرقات فراشة الطحين.

3-3-1- تحديد الوقت اللازم لقتل 50% ثم 100% من المجتمع الحشري(فراشة الشمع – فراشة الطحين):

أظهرت نتائج الاختبارمايلي :

<u>العزلة RST من الجنس*Steinernema*</u> أن الوقت اللازم لقتل 50% من يرقات فراشة الطحين يتراوح بين 1-3 أيام حيث تقل المدة بزيادة التركيز أما الوقت اللازم لقتل100% من هذه اليرقات

فكان يتراوح بين 2−5 أيام، أما يرقات فراشة الشمع فكانت المدة 1−2 يوم ومن 2−3 يوم كافية لقتل 50% ثم 100% من اليرقات على التوالي.

<u>العزلة VH من الجنس*Heterorhabditis*:</u> الوقت اللازم لقتل50% من يرقات فراشة الطحين 1−3 أيام ومن 2−5 أيام لقتل جميع اليرقات، في حين يرقات فراشة الشمع احتاجت من 1 إلى 2 يوم لقتل نصف عددها ومن 2−4 أيام لقتل كل اليرقات.

<u>العزلة PHA من الجنس *Heterorhabditis*:</u>كانت الفترة بين 1−3 أيام كافية لقتل نصف يرقات فراشة الطحين و2−5 أيام لقتل كل اليرقات، في حين مات نصف عدد يرقات فراشة الشمع بين 1−2 يوم وماتت كل اليرقات خلال 2−3 أيام.

<u>العزلة DKH من الجنس*Heterorhabditis*:</u> تحتاج النيماتودا إلى 1−3 أيام لقتل نصف عدد يرقات فراشة الطحين وإلى 2−4 يوم لقتل كل اليرقات، أما بالنسيبة ليرقات فراشة الشمع فإن 1−2 يوم كافية لقتل نصف عددها و2−3 يوم لقتل كل اليرقات.

بالنتيجة كانت يرقات فراشة الطحين على درجة عالية من الحساسية للإصابة بالنيماتودا وتقارب بحساسيتها يرقات فراشة الشمع.

3−3−2−تحديد الفترة اللازمة لخروج الأطوار المعدية من اليرقات المصابة والفترة التي استمرت فيها بالخروج :

تبين النتائج تفاوت هذه الفترة باختلاف العائل وباختلاف العزلة المستخدمة في عدوى هذا العائل وكانت وفق التالي:

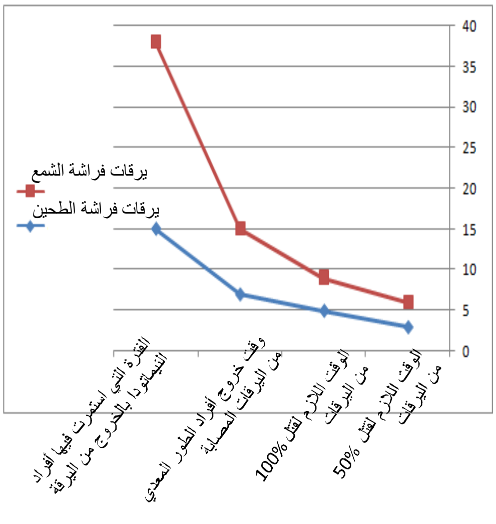
<u>العزلة RST من الجنس *Steinernema*</u> خرجت أفراد الطور المعدي من يرقات فراشة الطحين بعد 6 أيام من العدوى واستمر خروجها 15 يوم، وخرجت هذه الأفراد بعد 7 أيام من عدوى يرقات فراشة الشمع واستمر خروجها 20 يوم.

<u>العزلة VH من الجنس*Heterorhabditis*</u> : خرجت الأطوار المعدية من يرقات فراشة الطحين بعد 12 يوم من العدوى واستمر خروجها 10 أيام، أما يرقات فراشة الشمع فخرجت منها الأفراد بعد 13 يوم واستمر خروجها 15 يوم.

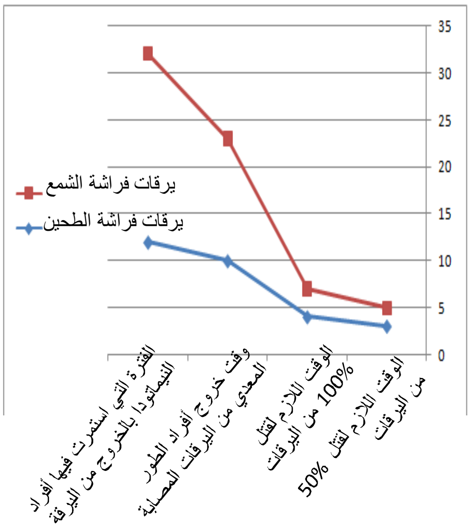
<u>العزلة PHA من الجنس*Heterorhabditis*:</u> خرجت الأفراد المعدية بعد 7 أيام من عدوى يرقات فراشة الطحين واستمر خروجها 15 يوم ، في حين خرجت هذه الأفراد بعد 8 أيام من عدوى يرقات فراشة الشمع واستمر خروجها 23 يوم .

<u>العزلة DKH من الجنس*Heterorhabditis* :</u> تم خروج الأفراد المعدية من يرقات فراشة الطحين بعد 10 أيام من الإصابة واستمر خروجها 12 يوم ، أما بالنسبة ليرقات فراشة الشمع فكان خروج الافراد بعد 13 يوم من الإصابة واستمر خروجها 20 يوم .

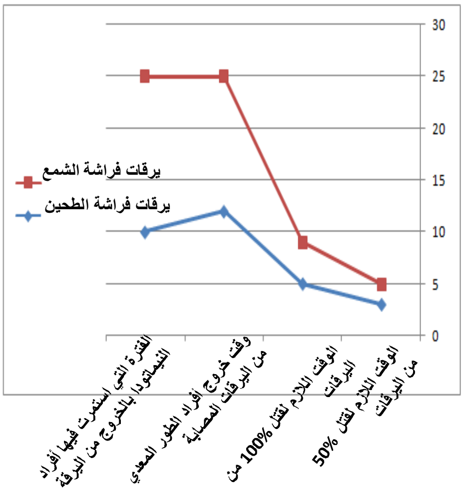
وتظهر مجمل البيانات أن دورة حياة النيماتودا تنتهي بوقت أقصر عند يرقات فراشة الطحين بالمقارنة مع يرقات فراشة الشمع وهذا موضح في الشكل (21) الذي يبين ديناميكية الحياة لعزلات النيماتودا ضمن العائلين المختلفين.



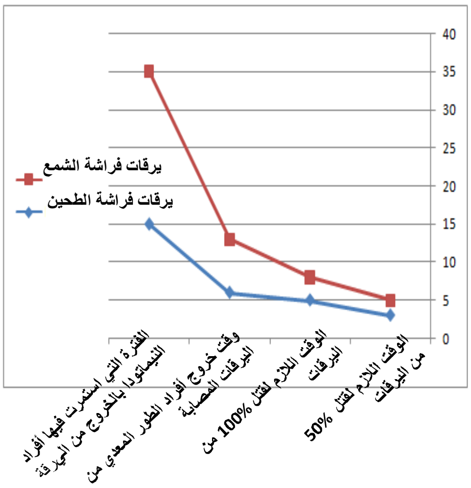
العزلة PHA من الجنس *Heterorhabditis*



العزلة DKHمن الجنس *Heterorhabditis*



العزلة VH من الجنس ***Heterorhabditis***



العزلة RST من الجنس ***Steinernema***

الشكل(21) ديناميكية الحياة لعزلات النيماتودا ضمن عائلين مختلفين

3-3-3-تحديد الكثافة العددية لأفراد الطور المعدي الخارجة من فراشة الطحين وفراشة الشمع :

تدل نتائج التحليل الإحصائي على اختلاف كثافة أعداد أفراد الطور المعدي ياختلاف العائل والعزلة والتركيز المستخدم في العدوى من كل عزلة ، حيث تم استخدام خمسة تراكيز من كل عزلة 50-100-250-500-1000طور معدي / مل وكانت النتائج كالتالي:

-<u>العزلة RST من الجنس*Steinernema*</u> : تراوحت كثافة الأطوار المعدية الخارجة من يرقة فراشة الشمع بين 91-123 ألف طور معدي / مل حسب التركيز المستخدم حيث ازداد العدد مع زيادة التركيز ، وتفوقت التراكيز 250-500-1000 معنوياً على باقي التراكيز حيث أعطت يرقات فراشة الشمع عند هذه التراكيز الكثافة العددية الأعلى من الطور المعدي .

-<u>العزلة VH من الجنس *Heterorhabditis*:</u> تراوح عدد الأفراد المعدية الخارجة من يرقات فراشة الشمع بين 86-134 ألف طور معدي / مل، ولم يكن هناك فروق معنوية بين التراكيز.

-<u>العزلة PHA من الجنس*Heterorhabditis* :</u> تراوح عدد أفراد الطور المعدي الخارجة من يرقات فراشة الشمع المعدية بهذه العزلة بين 76 – 115ألف طور معدي من اليرقة وكانت هناك فروق معنوية بين التراكيز حيث تفوق التركيزان 500-1000على باقي التراكيز .

-<u>العزلة DKH من الجنس*Heterorhabditis* :</u> تراوح عدد الأفراد الخارجة من يرقات فراشة الشمع المعدية بهذه العزلة بين 86-121 ألف فرد من اليرقة الواحدة ، وهناك فروق معنوية بين التراكيز حيث تفوقت التراكيز 250-500-1000 معنوياً على باقي التراكيز الجدول (13) .

الجدول رقم (13) **فاعلية العزلات المختلفة في الكثافة العددية لأفراد الطور المعدي الخارجة من يرقات فراشة الشمع .(العدد بالألف)**

التركيز	العزلة RST	العزلة VH	العزلة PHA	العزلة DKH
	Steinernema	*Heterorhabditis*	*Heterorhabditis*	*Heterorhabditis*
50	b 91.67	a 86.67	d 76.33	b 86.67
100	b 98.33	a 95.00	cd 86.67	b 87.33
250	a 113.33	a 102.00	bc 91.67	a 111.67
500	a 116.67	a 123.33	ab 101.66	a 115.00
1000	a 123.33	a 134.00	a 115.00	a 121.67

*القيم المتبوعة بأحرف مختلفة يوجد بينها فروق معنوية عند مستوى معنوية 0.05 .

بالنسبة ليرقات فراشة الطحين فكانت النتائج كالتالي :

-العزلة RST من الجنس*Steinernema* : تراوحت أعداد أفراد الطور المعدي بين 32- 54 ألف طور معدي / مل وكانت هناك فروق معنوية بين التراكيز حيث تفوق التركيزان 500-1000 معنوياً على باقي التراكيز وأعطت اليرقات عندها أعلى عدد.

-العزلة VH من الجنس *Heterorhabditis*:بلغ عدد الأفراد المعدية 36 – 20 ألف فرد من اليرقة الواحدة وكانت هناك فروق معنوية بين التراكيز حيث تفوق التركيزان1000- 500 طور معدي/ مل على باقي التراكيز كما تفوقت التراكيز 100 – 250 على التركيز 50 فرد / مل.

-العزلة PHA من الجنس*Heterorhabditis* : بلغ عدد الأفراد الناتجة عنها بين 31-57ألف فرد من اليرقة الواحدة وكانت هناك فروق معنوية بين التراكيز وتفوق التركيزان 1000-500 فرد/مل على باقي التراكيز.

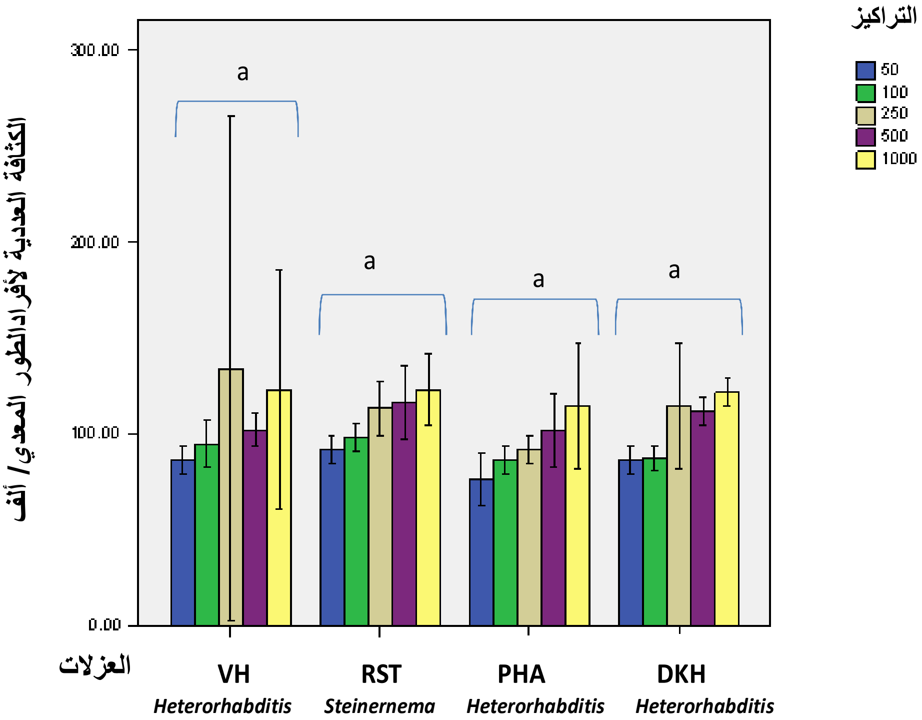
-العزلة DKH من الجنس*Heterorhabditis* : بلغ عدد الأفراد بين 36-51 ألف فرد من اليرقة الواحدة، وكانت هناك فروق معنوية بين التراكيز حيث تفوق التركيزان 500-1000 معنوياً على التركيز 250 وتفوق هذا الأخيرعلى باقي التراكيز الجدول (14)

الجدول(14): تأثير العزلات المختلفة من النيماتودا في تحديد الكثافة العددية لأفراد الطور المعدي الخارجة من يرقات فراشة الطحين.

التركيز	العزلة RST	العزلة VH	العزلة PHA	العزلة DKH
	Steinernema	*Heterorhabditis*	*Heterorhabditis*	*Heterorhabditis*
50	b 32.33	c 20.00	c 31.67	c 36.00
100	b 35.00	bc 27.00	bc 38.00	c 38.33
250	b 36.67	bc 27.33	b 43.33	b 43.33
500	a 46.67	ab 35.00	a 51.67	a 48.33
1000	a 54.67	a 36.66	a 57.33	a 51.67

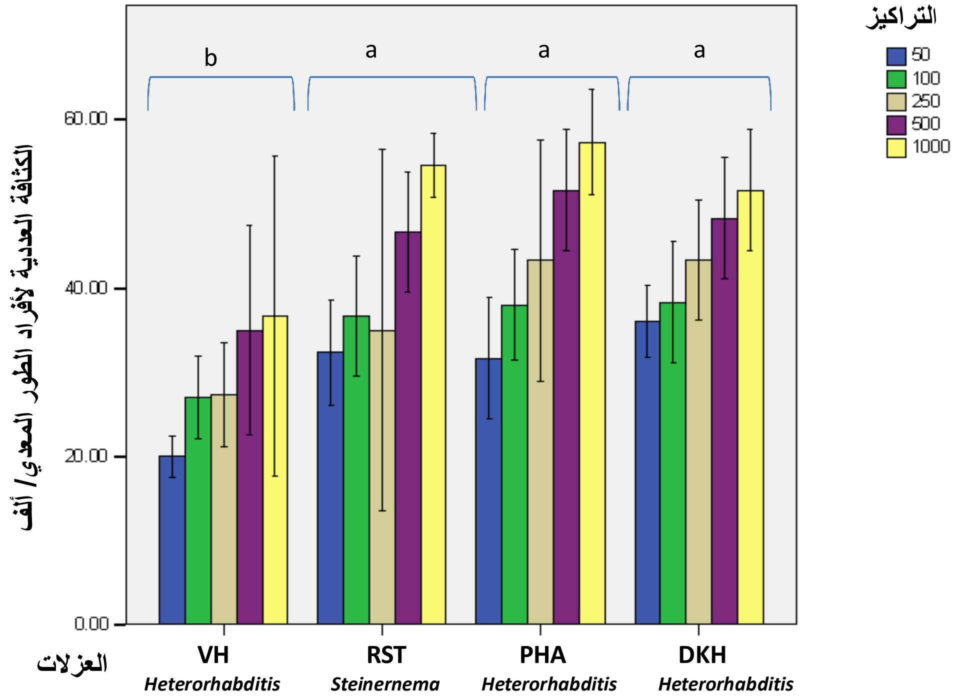
*القيم المتبوعة بأحرف مختلفة يوجد بينها فروق معنوية عند مستوى معنوية 0.05

ومن ناحية أخرى لم تشر نتائج التحليل الإحصائي إلى معنوية الفروق بين أعداد أفراد الطور المعدي الخارجة من يرقات فراشة الشمع المعداة بالعزلات المختلفة (RST من الجنس *Steinernema* و العزلات VH-PHA-DKH من الجنس *Heterorhabditis*) الشكل (22) .



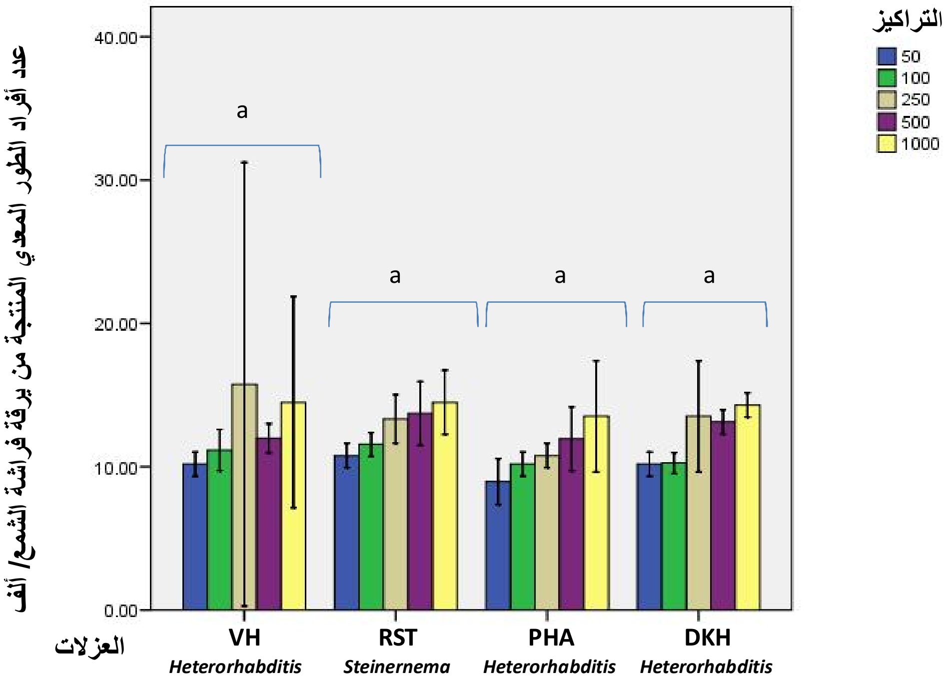
الشكل (22): تأثير العزلات المختلفة من النيماتودا في تحديد الكثافة العددية لأفراد الطور المعدي الخارجة من يرقات فراشة الشمع المعداة بعزلات مختلفة من النيماتودا .

بينما تفوقت العزلات RST – PHA – DKH معنوياً على العزلة VH وذلك عند استخدام هذه العزلات على يرقات فراشة الطحين وهذا موضح في الشكل (23) .



الشكل (23): تأثير العزلات المختلفة من النيماتودا في تحديد الكثافة العددية لأفراد الطور المعدي الخارجة من يرقات فراشة الطحين .

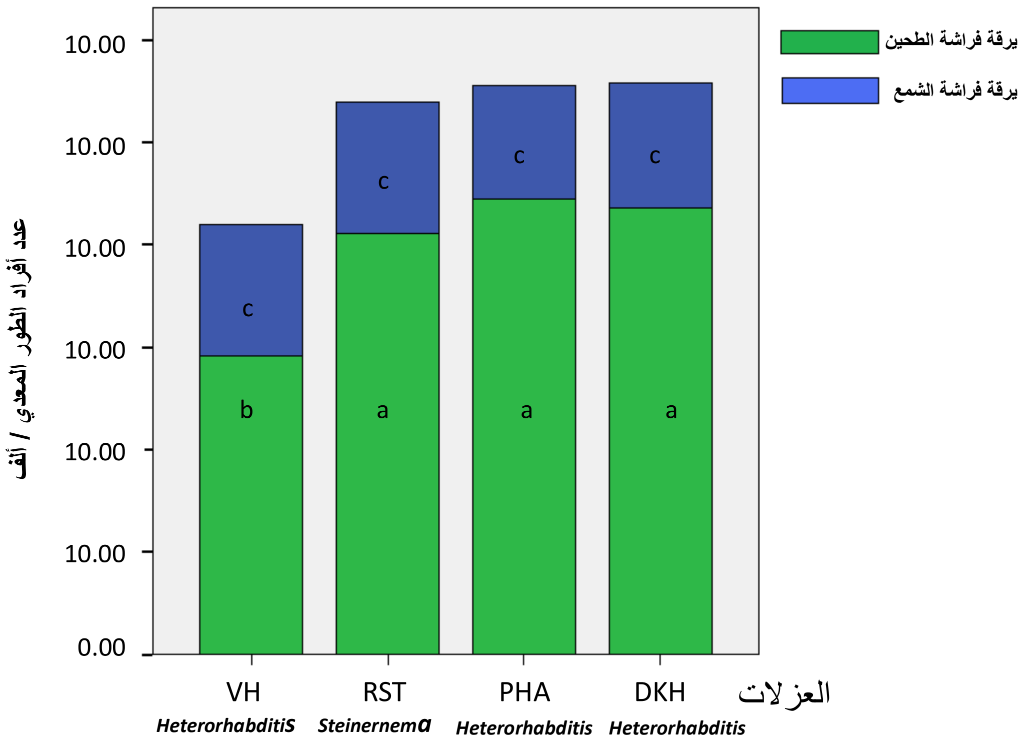
واستناداً إلى الدراسات المرجعية ذات الصلة والتي تشير إلى اختلاف عدد أفراد الطور المعدي المتحرر من يرقات الحشرات الميتة باختلاف عزلة ونوع النيماتودا ونوع العائل وحجمه وحساسية العائل للنيماتودا (Grewal *et al.*, 1994 ; Lewis *et al.*, 1996 ; Ünlü and Ozer , 2003) ومن أجل تحديد الإنتاج الكمي من وحدة وزن واحدة من العائل الحشري قمنا بتوحيد وزن العائل لنستطيع المقارنة بين العائلين وبالتالي تحديد امكانية التربية على عائل آخر، حيث تم أخذ متوسط أوزان 30 يرقة من يرقات فراشة الشمع فكان مساوياً 0.17غ لليرقة الواحدة، كما أخذ متوسط أوزان 30 يرقة من يرقات فراشة الطحين وكان مساوياً 0.02غ لليرقة الواحدة ثم تم حساب عدد أفراد الطور المعدي الخارجة من 0.02غ من وزن يرقة فراشة الشمع وهو المعادل لوزن يرقة فراشة الطحين(0.02g)، ويبين الشكل (24) الانتاج العددي ليرقة فراشة الشمع من الطور المعدي من وحدة الوزن 0.02غ.



الشكل (24) الكثافة العددية المنتجة من الطور المعدي من 0.02غ من يرقة فراشة الشمع.

وتشير نتائج تحليل التباين إلى معنوية الفروق في الإنتاج الكمي لأفراد الطور المعدي الناتجة من العائلين حيث تفوقت يرقات فراشة الطحين في إنتاجيتها لهذه الأفراد معنوياً على يرقات فراشة الشمع وذلك عند وحدة الوزن 0.02غ وبالتالي يمكن استخدام يرقات فراشة الطحين كعائل بديل لتربية وإنتاج النيماتودا الممرضة للحشرات بعد دراسة الجدوى الإقتصادية وتجدر الإشارة هنا إلى أن هذا التقييم يعد الأول في مجال دراسات النيماتودا الممرضة للحشرات على المستوى العالمي ولاتوجد دراسات مرجعية في هذا المجال .

ويوضح الشكل (25) الفرق بين إنتاجية يرقة فراشة الطحين ويرقة فراشة الشمع من الطور المعدي للنيماتودا .



*القيم المتبوعة بأحرف متشابهة لا توجد بينها فروق معنوية عند مستوى معنوية0.05.

الشكل (25)التباين بين إنتاجية يرقة فراشة الطحين ويرقة فراشة الشمع من الطور المعدي للنيماتودا

....

....

....

....

3-4-مكافحة دودة ثمار التفاح (*Cydia pomonella*) (Lepidoptera: Tortricidae) حيوياً باستخدام بعض عزلات النيماتودا الممرضة للحشرات والمستخلصة محلياً ضمن ظروف المخبر:

تم استخدام ثلاث عزلات من النيماتودا الممرضة والمستخلصة من ترب ريف دمشق إحداها من الجنس *Steinernema* وعزلتين من *الجنس Heterorhabditis* ويوضح الشكل (26) أعراض الإصابة بهذين الجنسين على يرقات دودة ثمار التفاح. استخدم من كل عزلة ثلاثة تراكيز -50-100 250فرد/مل وكانت النتائج كالتالي :

3-4-1- الوقت اللازم لقتل 50% من اليرقات المعاملة بالنيماتودا:





الشكل (26) أعراض الإصابة بالنيماتودا الممرضة للحشرات على يرقات دودة ثمار التفاح.

<u>-العزلة RST من الجنس *Steinernema*:</u> كان الوقت اللازم لقتل 50% من اليرقات المعاملة بالنيماتودا عند التركيز50 فرد/مل هو 48 ساعة وأيضاً عند التركيز 100فرد/مل كان الوقت اللازم 48 ساعة، وانخفض هذا الوقت عند التركيز 250 فرد/مل إلى 24ساعة .

وكانت نسبة الموت عند التركيز50 فرد/مل تساوي 78% ثم ارتفعت إلى 96% عند تطبيق التركيز100فرد/مل ، في حين وصلت هذه النسبة إلى 100% عند التركيز 250 فرد/مل وتدل نتائج التحليل الإحصائي على تفوق التركيزين 100-250 على التركيز50 معنوياً وكانت قيمة L.S.D=4.71 الجدول (15).

<u>-العزلة PHA من الجنس *Heterorhabditis*:</u>استغرق الوقت اللازم لقتل 50% من يرقات دودة ثمار التفاح 72ساعة عند التركيزين 50-100 فرد/مل في حين انخفض هذا الوقت إلى 48 ساعة عند التركيز 250 فرد/مل .

وبلغت نسبة الموت بعد 72 ساعة من العدوى 61% عند تطبيق التركيز50 فرد/مل وارتفعت هذه النسبة إلى 78% عند استخدام التركيز 100 فرد/مل في حين بلغت هذه النسبة 96% عند التركيز 250فرد/مل ، تفوق التركيز250 على التركيزين 50-100 فرد/مل عند مستوى معنوية 0.05 % كما تفوق التركيز100فرد/مل معنوياً على التركيز50 فرد/مل ، وكانت قيمة L.S.D=4.89 الجدول (15)

-<u>العزلة VH من الجنس *Heterorhabditis*</u> :الوقت اللازم لقتل 50% من اليرقات 48 ساعة عند التركيز 50 فرد/مل ، انخفض هذا الوقت إلى 24 ساعة عند التركيزين 100-250 فرد/مل ، بلغت نسبة الموت 62 % عند التركيز 50 فرد/مل وارتفعت هذه النسبة إلى 85 % عند التركيز 100 فرد/مل في حين كان التركيز 250 فرد/مل فعالاً جداً حيث حقق نسبة موت لليرقات قدرها 100% . تفوق التركيز 250 فرد/مل على بقية التراكيز المستخدمة عند مستوى معنوية 0.05 % ، كما تفوق التركيز 100فرد/مل معنوياً على التركيز 50 فرد/مل ، وكانت قيمة L.S.D=2.9 الجدول (15) .

جدول (15): نسبة الموت عند يرقات دودة ثمار التفاح عند تطبيق عزلات مختلفة من النيماتودا وتراكيز مختلفة .

العزلة	نسبة الموت %			L.S.D
	التركيز فرد/مل			
	50	100	250	
(Steinernema)RST	c 78.0 0	ab 96.00	a 100	4.71
(Heterorhabditis)PHA	c 61.67	b 78.33	a 96.33	4.89
(Heterorhabditis)VH	c 62.33	b 85.00	a 100	2.9
الشاهد	d 0	d 0	d 0	

3-4-2-الكـــثافة العددية لأفراد الطور المعدي الخارجة من يرقات دودة ثمار التفاح المصابة بالنيماتـــــودا:

أما بالنسبة للكثافة العددية لأفراد الطور المعدي الخارجة من يرقات دودة ثمار التفاح المصابة بالنيماتودا فقد اختلفت باختلاف عزلة النيماتودا المستخدمة والتركيز المطبق، بلغت أعداد أفراد الطور المعدي بالنسبة للعزلة RST من الجنس *Steinernema* 76ألف فرد/مل من اليرقة الواحدة عند التركيز 50 فرد/مل أما عند التركيز100 فرد/مل فقد بلغ عددها 88 ألف فرد في حين وصل هذا العدد إلى 94 ألف فرد عند التركيز 250 فرد/مل، وخرجت هذه الأفراد بعد 8 أيام من حدوث الإصابة، وتشير نتائج التحليل الإحصائي إلى تفوق التركيز250 فرد/مل معنوياً على التركيزين 50-100 فرد/مل ، وأيضاً تفوق التركيز 100 فرد/مل على التركيز 50 فرد/مل ، وكانت قيمة L.S.D=5.33 الجدول (16).

بلغت أعداد أفراد الطور المعدي بالنسبة للعزلة PHA من الجنس *Heterorhabditis* 56 ألف فرد/مل من اليرقة الواحدة عند التركيز 50 فرد/مل أما عند التركيز100 فرد/مل فقد بلغ عددها 65 ألف فرد في حين وصل هذا العدد إلى 71 ألف فرد عند التركيز 250 فرد/مل، وخرجت هذه الأفراد بعد 8 أيام من حدوث الإصابة، وتشير نتائج التحليل الإحصائي إلى تفوق التركيز250 فرد/مل معنوياً على التركيزين 50-100 فرد/مل ، في حين لم تكن هناك فروق معنوية بين التركيزين 100 – 50 فرد/مل، وكانت قيمة L.S.D=9.71 الجدول (16).

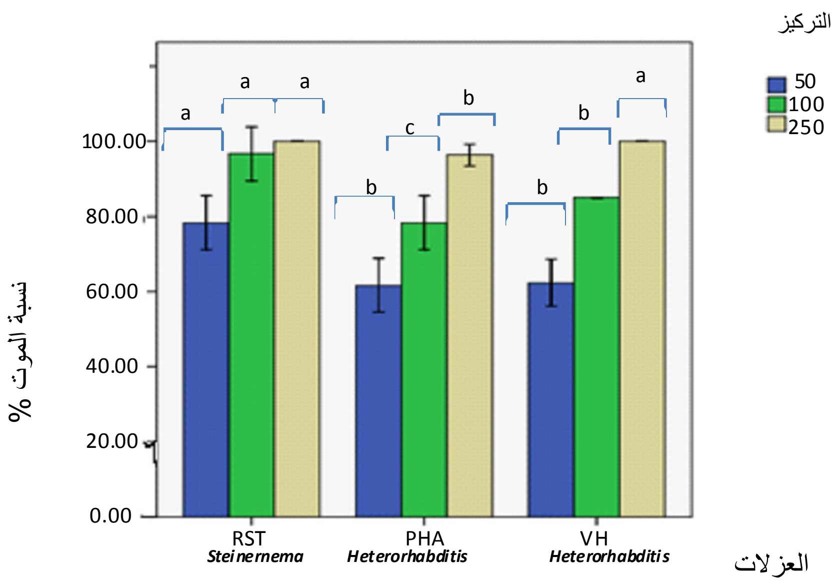
جدول (16): أعداد أفراد الطور المعدي(ألف) الخارجة من يرقات دودة ثمار التفاح المصابة بعزلات مختلفة من النيماتودا وبتراكيز مختلفة.

العزلة	التركيز			L.S.D
	50 فرد/مل	100 فرد/مل	250 فرد/مل	
(Steinernema)RST	c 76.00	b 88.00	a 94.33	5.33
(Heterorhabditis)PHA	c 56.67	ab 65.00	a 71.67	9.71
(Heterorhabditis)VH	c 71.67	ab 80.00	a 85.00	8.81

* القيم المتبوعة بأحرف متشابهة لاتوجد بينها فروق معنوية عند مستوى معنوية0.05 .

بلغت أعداد أفراد الطور المعدي بالنسبة للعزلة VH من الجنس *Heterorhabditis* 71 ألف فرد/مل من اليرقة الواحدة عند التركيز 50 فرد/مل أما عند التركيز 100 فرد/مل فقد بلغ عددها 80 ألف فرد في حين وصل هذا العدد إلى 85 ألف فرد عند التركيز 250 فرد/مل ، وخرجت هذه الأفراد بعد 8 أيام من حدوث الإصابة، وتشير نتائج التحليل الإحصائي إلى تفوق التركيز 250 فرد/مل معنوياً على التركيز 50 فرد/مل ، في حين لم تكن هناك فروق معنوية بين التركيزين 100 – 250 فرد/مل، وكانت قيمة L.S.D=8.81 الجدول (16)

حققت العزلة RST من الجنس *Steinernema* تفوقاً ملحوظاً ومعنوياً على العزلتين PHA – VH من الجنس *Heterorhabditis* من حيث نسبة الموت وذلك عند استخدام التركيز 50 فرد/مل وأيضاً عند التركيز 100 فرد/مل، أما عند استخدام التركيز 250 فرد/مل فقد تفوقت العزلتان VH(*Heterorhabditis*) و RST(*Steinernema*) على العزلة PHA من الجنس *Heterorhabditis* الشكل (27).



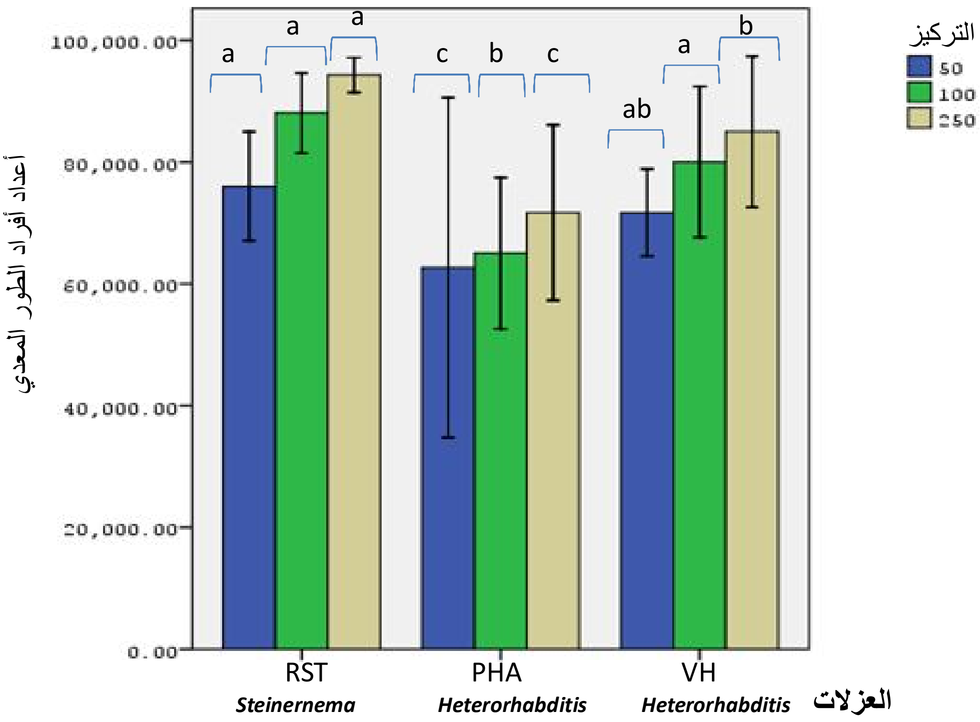
* القيم المتبوعة بأحرف متشابهة لاتوجد بينها فروق معنوية عند مستوى معنوية 0.05 .

الشكل (27): النسبة المئوية للموت في يرقات دودة ثمار التفاح
نتيجة تطبيق عزلات مختلفة من النيماتودا وتراكيز مختلفة لكل عزلة.

تفوقت العزلتان VH(*Heterorhabditis*) و RST(*Steinernema*) عند التركيــزين-100 50 فرد/مل على العزلة PH(*Heterorhabditis*) معنوياً وذلك عند مستوى ثقة 0.05 مــن حيــث أعداد أفراد الطور المعدي الخارجة من اليرقات ، أما عند التركيز 250 فرد/مل فكانت نتائج التحليــل الإحصائي تشير إلى تفوق العزلة RST(*Steinernema*) معنوياً على العــزلتين VH وPHA مــن الجنس(*Heterorhabditis*) الشكل (28)

توضح هذه النتائج القدرة العالية للجنس *Steinernema* في مكافحة دودة ثمار التفاح وبالتالي الحساسية المرتفعة ليرقات هذه الحشرة اتجاه النيماتودا الممرضة للحشرات بشكل عام وإلى الجنس *Steinernema* بشكل خاص وهذا يتفق مع ماتوصل إليه Curto وآخرون(2008)من حيث تفوق الجنس *Steinernema* وبشكل خاص النوع *S.feltiae* معنوياً على بقية الأنواع المستخدمة في مكافحة يرقات دودة ثمار التفاح .

وتشير الدراسات المرجعية (Lacy *et al*., 2006) أن الطور المناسب لمكافحة دودة ثمار التفاح هو طور السكون (طور اليرقة المتشرنقة) وهو الطور الذي طبقت عليه المكافحة في بحثنا هذا وأعطت نتائج جيدة ومن الجدير بالذكر أنه تم دراسة المدى الحراري للعزلة RST(*Steinernema*) وكانت فعالة جداً تحت درجات الحرارة المنخفضة(15مْ) من حيث نسية القتل وعدد الأفراد الناتجة من اليرقات المصابة ، علماً أن استخدام النوعين *S.carpocapae – S.feltiae* لمكافحة دودة ثمار التفاح في طور البيات الشتوي أعطت نتائج جيدة عندما تم التطبيق على درجة الحرارة 15مْ .(Lacey,2000)



*** القيم المتبوعة بأحرف متشابهة لاتوجد بينها فروق معنوية عند مستوى معنوية 5% علماً الفروق تدرس هنا بين العزلات ضمن التركيز الواحد .**

الشكل (28) الكثافة العددية لأفراد الطور المعدي الخارجة من يرقات دودة ثمار التفاح المصابة بعزلات مختلفة وتراكيز مختلفة من النيماتودا الممرضة للحشرات.

....

....

....

....

3-5- مكافحة يرقات حفار ساق التفاح (Zeuzera pyrina)(Lepidoptera:Cossidae) بالنيماتودا الممرضة للحشرات مخبرياً وحقلياً :

تم استخدام عزلتين من النيماتودا الممرضة للحشرات والمعزولة من ترب ريف دمشق وهي : العزلة RST من الجنس *Steinernema* والعزلة PHA من الجنس *Heterorhabditis* ، تم تطبيق تركيزين من كل عزلة 50 – 100فرد معدي / مل .

3-5-1- فاعلية النيماتودا ضد يرقات حفار ساق التفاح مخبرياً :

حققت النيماتودا نسب موت عالية ليرقات حفار ساق التفاح وذلك بعد يومين من تطبيق النيماتودا ، بالنسبة للعزلة RST من الجنس *Steinernema* بلغ متوسط نسبة الموت 87.5% وذلك باستخدام التركيز 50 فرد معدي/مل، وارتفعت هذه النسبة حتى وصلت إلى 100% عند التركيز 100فرد/مل الجدول (17). ويبين الشكل (29) أعراض الإصابة بهذا الجنس .



الشكل (29) الإصابة بالجنس *Steinernema*

العزلة PHA من الجنس *Heterorhabditis* حققت نسبة موت متوسطها 75.00% عند التركيز 50 فرد/مل ، في حين بلغت 100% عند تطبيق التركيز 100فرد/مل الجدول (17). ويبين الشكل (30) أعراض الإصابة على يرقات حفار ساق التفاح بهذا الجنس.



الشكل (30) الإصابة بالجنس *Heterorhabditis*

ومن الجدير بالذكر أن هاتين العزلتين من النيماتودا عند استخدامها بتركيز 25-50 فرد/مل فإنها تسبب نسبة موت 80-100% ليرقات دودة الشمع الكبرى *G.mellonella* المعروفة بشدة حساسيتها للإصابة بالنيماتودا الممرضة للحشرات مما يدل على أن يرقات حفار ساق التفاح حساسة للإصابة بالنيماتودا الممرضة بدرجة تقارب حساسية دودة الشمع الكبرى .

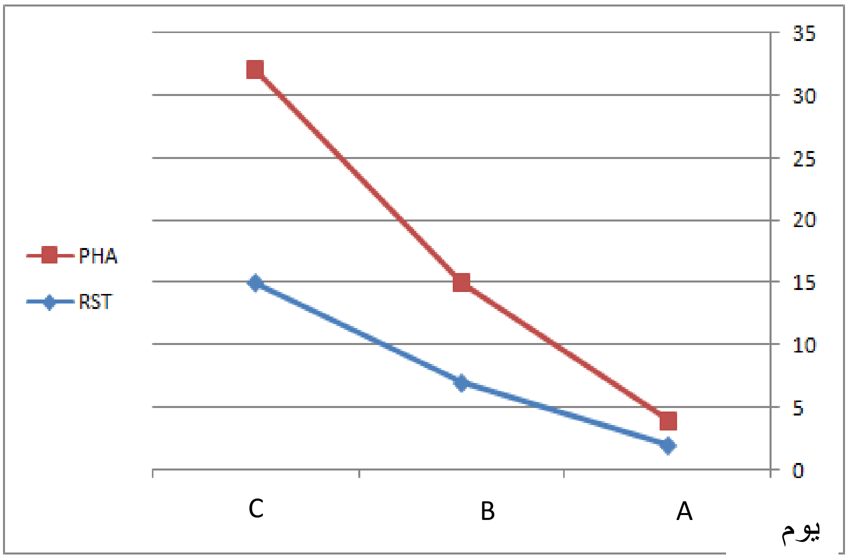
جدول (17) نسب الموت عند يرقات حفار ساق التفاح نتيجة العدوى بعزلات مختلفة من النيماتودا

العزلة	نسبة الموت %	
	التركيز	
	50 فرد معدي / مل	100 فرد معدي / مل
(*Steinernema*) RST	87.5 a	100 a
PHA (*Heterorhabditis*)	75 a	100 a
الشاهد	0 b	0 b

الفروق معنوية مع الشاهد

وقد أشار Kondo و Ishibashi (1987) إلى أن الحشرات الساكنة في التربة أقل حساسية للنيماتودا من تلك التي تعيش على سطح التربة، وإن الحساسية العالية عند بعض الحشرات للنيماتودا تأتي من فقدان ميكانيكية الدفاع عن نفسها ضد النيماتودا و/ أو البكتريا المتعايشة معها بالإضافة إلى أن اختلاف قدرة النيماتودا على قتل العائل باختلاف العزلة والنوع وعدد يرقات الطور المعدي، وبشكل عام يتطلب قتل الفرد الواحد من العائل فرد معدي واحد من النيماتودا التابعة الجنس *Heterorhabditis* في حين يجب وجود فردين من النيماتودا أحدهما ذكر والآخر أنثى في حال العدوى بالجنس *Steinernema* (Converse and Miller , 1999). ويوضح الشكل (31) ديناميكية الحياة لعزلات النيماتودا ضمن يرقات حفار ساق التفاح، حيث أنهت أفراد العزلة RST دورة حياتها بفترة قصيرة مقارنة مع العزلة PHA.

A وقت الموت
B وقت خروج أفراد الطور المعدي
C الفترة التي استمرت فيها أفراد الطور المعدي بالخروج من اليرقات

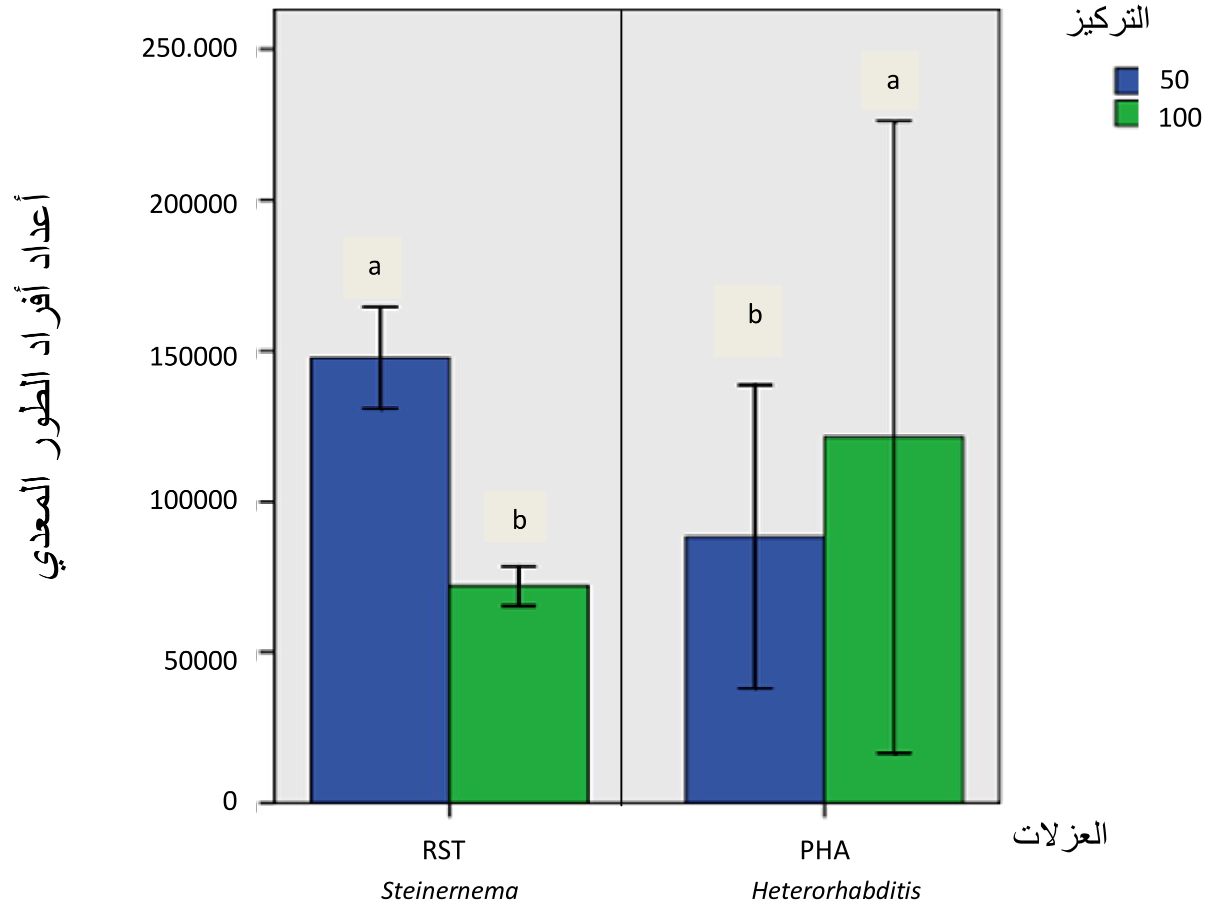


الشكل (31) ديناميكية الحياة لعزلات النيماتودا ضمن يرقات حفار ساق التفاح

3-5-1-1-الكثافة العددية لأفراد النيماتودا الخارجة من يرقات حفار ساق التفاح :

اختلفت أعداد أفراد الطور المعدي الخارجة من يرقات حفار ساق التفاح باختلاف العزلة وباختلاف التركيز ، بالنسبة للعزلة RST من الجنس *Steinernema* بلغ متوسط عدد الأفراد الناتجة 147666.67 فرد معدي وذلك عند التركيز 50 فرد /مل ، أما عند التركيز 100 فرد /مل فكان متوسط عدد الأفراد 72000 فرد معدي وأظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين التركيزين وذلك عند مستوى معنوية 5% .

بلغ متوسط عدد الأفراد الناتجة من العدوى بالعزلة PHA من الجنس *Heterorhabditis* 88333.33 فرد معدي عند التركيز 50 فرد معدي /مل ، أما عند التركيز 100فرد معدي /مل فكان متوسط عدد الأفراد الناتجة 121333 فرد معدي ، ودلت نتائج التحليل الإحصائي على وجود فروق معنوية بين التراكيز وذلك عند مستوى معنوية 5% ، الشكل (32)



* القيم المتبوعة بأحرف مختلفة توجد بينها فروق معنوية عند مستوى معنوية 5%، علماً أن المقارنة بين التركيزين ضمن العزلة الواحدة

شكل (32) التباين في معدل التكاثر بين عزلتين من النيماتودا الممرضة للحشرات وبتركيزين مختلفين ضمن يرقات حفار ساق التفاح

تدل نتائج التحليل الإحصائي على معنوية الفروقات بين العزلات في معدل التكاثر وذلك عند المستوى 5% ، حيث تفوقت العزلة RST من الجنس *Steinernema* من حيث معدل التكاثر على العزلة PHA من الجنس *Heterorhabditis* وأعطت عدد كبير من أفراد النيماتودا (الطور المعدي) وذلك عند التركيز 50 فرد معدي/مل .

في حين لم تكن هناك فروق معنوية بين العزلات المختلفة عند تطبيق التركيز 100 فرد/مل . تتفق نتائج هذه الدراسة مع الدراسات المرجعية ذات الصلة والتي تشير إلى اختلاف أعداد الطور المعدي المتحرر من العائل باختلاف العزلة ونوعها وكذلك حجم ونوع العائل والظروف البيئية المحيطة كالحرارة والرطوبة (Unlu and Ozer, 2003 ; Lewis *et al*., 1996)

3-5-2- التطبيقات شبه الحقلية للنيماتودا الممرضة للحشرات على أفرع التفاح :

استخدمت العزلات (PHA – RST) بتركيز 1000طور معدي / مل لمكافحة يرقات حفار ساق التفاح داخل أفرع تفاح مصابة وذلك ضمن الظروف المخبرية (الحرارة 25-30مْ ووضعت الأفرع في بيشر كبير يحتوي ماء للمحافظة على الرطوبة) بطريقة حقن المعلق النيماتودي بواسطة محقن يدوي سعة 5 مل داخل النفق النشط ، أو رش المعلق على الأفرع مباشرة .

أخذت النتائج لطريقة الحقن بعد أسبوع من المعاملة وكان متوسط نسبة الموت التي حققتها العزلة RST من الجنس *Steinernema* 76.5 % أما بالنسبة للعزلة PHA من الجنس *Heterorhabditis* فكان متوسط نسبة الموت يساوي 67.6% ، ولم تشر نتائج التحليل الإحصائي إلى وجود فروق معنوية بين العزلتين .

أما في حالة طريقة الرش بالمحلول النيماتودي فلم تحقق نسبة موت عالية حيث كان متوسط نسبة الموت 20% بالنسبة للعزلة RST في حين ارتفعت النسبة قليلاً عند العزلة PHA فأصبح متوسطها 25.41% ، ولم تشير نتائج التحليل الإحصائي إلى وجود فروق معنوية بينها .

ويعزا هذا التفاوت في نسب الموت بين الطريقتين أن طريقة الرش تستلزم مقدرة خاصة لدى النيماتودا للتعرف على مكان اليرقة والوصول إليها وقتلها ، أما في طريقة الحقن فهي تضمن سهولة وصول النيماتودا إلى يرقة الآفة أو إلى منطقة قريبة منها .

3-5-3-التطبيق الحقلي للنيماتودا الممرضة للحشرات على الأشجار:

تم تطبيق عزلات النيماتودا التي استخدمت في المخبر على أشجار زيتون مصابة بحفار ساق التفاح وذلك ضمن الظروف الحقلية واتبعت طريقتين للمكافحة: (كل شجرة فيها أربعة أنفاق، كل نفق اعتبر مكرر)

تم في الطريقة الأولى حقن المعلق المائي النيماتودي بتركيز 1000 فرد/مل بواسطة محقن يدوي سعة 10مل داخل الأنفاق النشطة حيث حقنت خمس أشجار بالعزلة RST وخمسة أخرى بالعزلة PHA وتم حقن شجرتيين بالماء كشاهد للمقارنة .

أخذت نتائج التجربة بعد عشرة أيام من التطبيق الشكل(33) يوضح نتائج التطبيق الحقلي بإصابة اليرقات داخل النفق بالنيماتودا الممرضة للحشرات) فكانت كالتالي :
حققت العزلة RST من الجنس *Steinernema* نسبة موت متوسطها 45.67% أما العزلة PHA من الجنس *Heterorhabditis* فقد حققت نسبة موت متوسطها 66.65% .

وتم في الطريقة الثانية وضع يرقة من يرقات دودة الشمع المصابة بالنيماتودا داخل النفق النشط ومن ثم إغلاق النفق بالطين ، أخذت النتائج وكان متوسط نسبة الموت التي حققتها العزلةRST من الجنس *Steinernema* 39.47 % ، العزلة PHA من الجنس *Heterorhabditis* 41.67 % الجدول (18) .



الشكل (33) نتائج التطبيق الحقلي إصابة اليرقات داخل النفق .

جدول (18) تأثير طريقة تطبيق النيماتودا على الأشجار المصابة بحفار ساق التفاح في متوسط نسبة الموت .

العزلة	متوسط نسبة الموت %	
	طريقة الحقن بالمعلق النيماتودي	طريقة وضع يرقات من دودة الشمع مصابة بالنيماتودا
(*Steinernema*) RST	45.67 a	39.47 b
(*Heterorhabditis*) PHA	66.65 a	41.67 b
الشاهد	0 c	0 c

* الفروق معنوية بين الأحرف المختلفة (بين الطريقتين ضمن العزلة الواحدة ومع الشاهد)

تشير هذه النتائج إلى اختلاف مقدرة النيماتودا بالوصول إلى العائل وذلك باختلاف طريقة التطبيق والأنواع والعزلات وأيضاً إلى اختلاف قدرتها على تحمل درجات الحرارة والجفاف وهذا ماأشار إليه Gray و Webester (1986) من حيث السلوك المختلف لسلالات النيماتودا ترجع إلى الإختلاف في طرق البحث عن العائل، القدرة على الإختراق، الإختلاف في أنواع التوكسينات المفرزة من قبل المعقد نيماتودا – بكتريا، وأيضاً قدرة النيماتودا على العدوى في مدى حراري معين وقدرة تحملها للجفاف (Grewal *et al*., 1993).

....

....

....

الاستنتاجات

1- تنتشر النيماتودا الممرضة للحشرات في العديد من الحقول والبساتين في محافظة ريف دمــشق، وهي مترافقة مع أشجار اللوزيات والتفاحيات والحمضيات والجوز والعنب.

2- يعتبر تحديد النوع *H.zealandica* هو التسجيل الأول في سوريا.

3- تعتبر عزلات الجنس *Steinernema* أكثر تأقلماً مع درجات الحــرارة المنخفــضة وبالتــالي يمكن استخدامها في المناطق ذات درجات الحرارة المنخفضة بينما يفضل اســتخدام عــزلات الجنس *Heterorhabditis* في المناطق الحارة.

4- يمكن استخدام يرقات فراشة الطحين كعائل بديل وبكفاءة عالية عن يرقات دودة الشمع للإكثار الكمي للنيماتودا الممرضة للحشرات.

5- تمكنت العزلات المحلية للنيماتودا من تحقيق نسبة موت عالية ليرقات دودة ثمار التفاح وكانت عزلات الجنس *Steinernema* هي الأكثر كفاءة.

6- أبدت العزلات المحلية للنيماتودا قدرة عالية على مكافحة يرقات حفار ساق التفــاح مخبريــاً، وأعطت هذه العزلات نتائج جيدة لمكافحة حفار ساق التفاح حقلياً عند استخدامها بطريقة حقــن المعلق النيماتودي داخل النفق.

التوصيات

1- متابعة الأبحاث عن انتشار النيماتودا الممرضة للحشرات في البيئة السورية وتحديد توزعها وانتشارها ودراسة العوامل البيئية والحيوية التي تؤثر في معدل نموها وبقائها وكفائتها في المكافحة.

2- تحديد الأنواع التي تنتمي إليها عزلات النيماتودا المستخلصة بالاعتماد على القياسات البيومترية والتقانات الحيوية.

3- يوصى باستخدام النيماتودا الممرضة للحشرات والمستخلصة محلياً كعامل مكافحة حيوية ضد الآفات الحشرية المنتشرة في البيئة المحلية السورية وخاصة حفار ساق التفاح ودودة ثمار التفاح مع مراعاة استخدام الجنس *Steinernema* في المناطق المعتدلة والباردة والجنس *Heterorhabditis* في المناطق الأكثر حرارة.

4- تربية وإكثار النيماتودا الممرضة للحشرات في الظروف المخبرية، واستيعاب الأسس النظرية والعملية الخاصة بهذه التربية، مع تجهيز غرف ووحدات لتربيتها وإكثارها في مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية في كلية الزراعة–جامعة دمشق كنواة لتعميمها على مراكز تربية وإنتاج الأعداء الحيوية في القطر.

5- متابعة الأبحاث الخاصة بدراسة الجدوى الإقتصادية للتربية الكمية للنيماتودا على يرقات فراشة الطحين.

6- إدراج تطبيق النيماتودا الممرضة للحشرات ضد يرقات حفار ساق التفاح ضمن برامج المكافحة المتكاملة.

Abstract

Occurrence Of Entomopathogenic Nematodes At Damascus Governorate And Evaluating Its Pathogenicity On Some Insect Hosts

This study aimed to investigate the prevalence of entomopathogenic nematodes (EPN) in tree orchards and crop fields in the province of Damascus countryside. The recovered EPN isolates were evaluated for their efficiencies under different temperatures regimes. This study was also aimed to test the possibility of the mass-rearing of EPN infective juveniles (IJs) on flour butterfly larvae. In this study we also evaluated *In vitro* the effectiveness of some recovered EPN isolates against two pests; apple codling moth larvae and apple stem borer.

In order to achieve these goals, an extensive survey for all Damascus countryside was conducted during the period between the beginning of March and the end of June 2008. A total of 189 soil samples were collected from groves of fruit trees, vegetables and field crops, poplar orchards, and from some grassland.

The presence of EPN was detected using the wax moth bait method. The wax moth was reared in our laboratory. Results revealed that 8.99% of the total samples were positive, since EPNs were recovered from 17 samples collected from 11 districts, namely: Assal-Elwred, Hosh-Arabs, Rnques, Alnhabbip, Karabo, Marj-Al-Sultan, Jisser-Ghaydah, Harran-Awameed, Abu-Jerash, Hinneh and Beit-Jenn.

The results also showed that the largest nematodes proportion (58.8%) was found in soils taken from areas planted with stone fruits trees. Whereas, a total of 17.6% of recovered EPN were isolated from pome fruits orchards. However, the percentages of EPN that were isolated from soils derived from citrus groves, vineyards, and walnuts were 11.7, 5.8, and 5.8, respectively. On the other hand, EPN were not detected in any soil samples taken from fields planted with vegetables, field crops, grass lawns, poplars or olive trees.

Based on taxonomic characteristics and infection symptoms, six samples had EPN individuals belonged to the genus *Steinenema* and comprised 35.29% while 11 samples contained individuals belonged to the genus *Heterorhabditis* that comprised 64.70%.

The two nematode isolates MSKH and GLA were identified as *H. zealandica* Poinar, 1990. The identification of these two isolates was based on morphological characteristics and biometric measurements of males and third juvenile stages (IJ3). Herein we reported the first record of this species in Syria.

The efficacy of six EPN isolates, 3 belongs to *Heterorhabditis* and 3 belongs to *Steinernema,* was investigated under different temperature (30-25-20- and 15°C) regimes. The results showed that the temperature 25°C was the optimal for all isolates in terms of the insect death rate. On the other hand, *Steinernema* isolates caused the highest percentages of death of wax moth larvae and greatest number of IJs at 15°C while *Heterorhabditis* isolates caused the highest rate of deaths of wax moth larvae and greatest IJs when the temperature was 30°C. The time required to kill 50% of the wax moth larvae decreased as

the incubation temperature increased. Infectious individuals of *Steinernema* isolate RST did not exit at this temperature and the few IJs that emerged from the isolates RM-RTA of the genus *Steinernema* at 30°C were weak.

One *Steinernema* isolate and three isolates of *Heterorhabditis* were chosen to test the possibility of mass-production on the flour butterfly *Ephestia kuehniella.* Five concentrations, 1000-500-250-100-50 IJs/ml, were used in this assay. The results showed that the flour butterfly was highly sensitive to nematode infection. Furthermore, the life cycle of each tested EPN isolate was shorter when larvae of flour butterfly were used as a host compared with those when wax moth larvae were the hosts. An average of 15-10 thousands EPN IJs emerged from wax moth larva with a 0.02 g weight, while the average production per larva of a flour butterfly of the same weight was about 57-36 thousands IJs. This means that the flour butterfly larvae were significantly better in the mass-production of infectious individual comparing to the wax moth larvae. This finding is considered a pioneer in the field of EPN.

Results of laboratory evaluation of the effectiveness of three isolates of EPN against cocoons of apple codling moth showed that the highest ability to kill the larvae was for the *Steinernema* isolates.

In order to evaluate the effectiveness of two of entomopathogenic nematode isolates against apple stem borer larvae. The results showed high potential for isolates of both nematode genera to infect apple stem borer larvae and the achievement of a large reproduction rate of nematodes in the larvae.

In the In vivo experiment two application methods of EPN were followed to suppress apple stem bore. The first method was applied by injecting nematode suspension within the tunnels and the second method by spraying nematode suspension on the infected branches. Results showed that the injection method was superior to the other method since a high rate of death of the insect larvae occurred and reached 76.5-67.6% compared to the spraying method, which killed only 25.4-20.0% of stem borer larvae.

In the field experiment two EPN application methods were tested. The first method was employed by injecting 10 ml containing 1000IJs into the active tunnel while the other method was applied by placing wax worm larvae infected with EPN inside the tunnel. The results showed that the two methods suppressed apple stem borer but the injection method was more effective

....

....

....

....

المراجع العربية:

1. أبو طارة، رندة فارس. 2008. دراسة بيئية وحيوية للطفيليين *Eretrnocerus mundus* & *Encarsia Formosa* وتأثير بعض المبيدات عليهما بهدف إدراجهما في برنامج المكافحة المتكاملة لذبابة التبغ البيضاء *Bemisia tabaci*. رسالة دكتوراه. جامعة دمشق، سوريا. 198ص.

2. الربيعي، حسين فاضل، سميرة عودة خليوي، إبراهيم جدوع جبوري، حمدية زاير وعلي حافظ 2002. الاتجاهات الحديثة لاستخدام الفرمونات في خفض تعداد دودة ثمار التفاح *Carpocapsa pomonella* (Lepidoptera : Tortricidae)*حقلياً*. المؤتمر الدولي الثاني ، معهد أبحاث وقاية النبات القاهرة، مصر، 21-24 كانون الثاني.

3. فتّوح، عبد الحميد عبد الفتاح ; إبراهيم سمير الشريف ; أنطوان ولسن تادرس 1999. مشاهدات أولية عن بعض الآفات الحشرية التي تصيب أشجار التفاحيات في سوريا. مجلة وقاية النبات العربية. المجلد 17، عدد1:31 -32.

4. مسلم، زكريا. 2009. فاعلية النيماتودا الممرضة للحشرات في مكافحة حشرة الكابنودس *Capnodis* spp في حقول اللوزيات. رسالة دكتوراه. جامعة تشرين، سوريا.117ص.

المراجع الأجنبية:

1. Abbas, M. S. T. and S. P. Hominicik. 1999. Pathogenicity of entomopathogenic nematodes to red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. International Journal of Nematology, 9 (1): 84-86.
2. Abbas, M. S. T., M. M. Saleh and A. M. Akil. 2001a. Laboratory and field evaluation of the Pathogenicity of entomopathogenic nematodes to red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Oliv) (Col.: Curculionidae). Anzeiger fur Schadlingskunde, 74(6):167-168.
3. Abd EL-Rahman, R.M., I.A.Maha., A.Evoon., Osman and S.S.EL-badawey. 2008. Laboratory evaluation of three Egyptian Heterorhabditid(Heterorhabditidae) and one imported Steinernemated nematodes(Steinernematidae) against mealybugs *Planococcus citri* and *Icerya aegyptiaca* (Homoptera:Pseudococcidae and Margarodidae) Egypt.J.Agric.Res.,86(2)659-668
4. Adams . B. J. and K. B. Nguyen . 2003.Taxonomy and systematics. Pp. 1-33 in : R. Gaugler(ed). Entomopathogenic Nematology. CABI publishing . Walling. UK
5. Adams, B. J; Nguyen, K. B. 2002. Taxonomy and systamatics in: Gaugler, R(Ed). Entomopathogenic Nematology. CAB International publishing, Wallingford, UK, 1-33.
6. Akhurst, R. J. and W. M. Brooks. 1984. The distribution of entomophilic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) in North Carolina. J. Invertebr. Pathol. 44: 140-145.
7. Akhurst, R. J. 1986. *Xenorhabdus nematophilus* spp. *poinarii*: its interaction with insect pathogenic nematodes. Systematic and Applied Microbiolog. 8:142-147.
8. Akhurst, R. J., and R. A. Bedding. 1986. Natural occurrence of insect pathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in soil Australia. J. Aust. Entomol. Soc. 25, 241-244.
9. Akhurst, R. J; W. M. Brooks. 1984. The distribution of entomophilic nematodes Steinernematidae and Heterorhabditidae in North Carolina. J. Invertebr. Pathol. 44: 140-145.
10. Akhurst, R.J. 1986. Controlling insect in soil with entomopathogenic nematodes. In : Samson, R. A. Valk;, J. M., and Peters, D.(eds), Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology. Fourth

International Colloquium of Invertebrate Pathology, Wageningen, The Netherland, pp. 265-276.

11. AL-Jboory, I. J; AL-Zubaii I.A. 2006. New record of entomopathogenic nematode from Iraq. Arab. J. P. Prot. 24(56).
12. Anonymous. 2008. Codling moth information support system (CMISS). (http: www.ipc.orst.edu).
13. Ash, C. P. J. and H. J. Atkinson. 1983. Evidence for a temperature dependent conversion of lipid reserves to carbohydrate in quiescent eggs of the nematodes. *Nematodirus Battus*. Comparative Biochemical Physiology. 104, 117-120.
14. Atwa, A. A. 1999 .Interaction of Certain insectides and entomopathogenic nematodes in controlling some insect pest on fruit and vegetable crops. M.SC. Thesis, Faculty of Agriclture. UniverSity of Ain Shams, Cairo Egypt.
15. Barbercheck, M. E; Kaya, H. K. 1975. Effect of host condition and soil texture on host finding by the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* (Rhabditida : Heterorhabditidae). and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida : Steinernematidae). Environmental Ent. 21: 109-110.
16. Barnett, W. W., Bentley, W.J., Bethell, R. S., Pickel, C.,Weddle, P. W & Zalom, F. G. 1991. Integrated Pest Management for apples and pears. University of California, publication 3340pp. 68-89.
17. Bedding R.R. Akurst and H. kaya (eds). 1993. Nematodes and the Biological control of insect Pests. East Melbourne. Australia. CSIRO publications.
18. Bedding, R. A. 1984. Large scale production, storage and transport, the insect-parasitic nematodes *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. Ann. of Applied Biology 104, 117-120.
19. Bedding, R. A; Akhurst, R. J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic nematodes in the soil. Nematologica 21: 109-110.
20. Beers, E. H., Brunner, J. F., Willet, M. J & Warner, G. M. 1993. Orchards pest management: a resource book for the Pacific Northwest: Good Fruit Grower, Yakima, WA.
21. Boag, B., R. Neilson, and S. C. Gordon. 1992. Distribution and prevalence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* in Scotland. Ann. App. Biol. 121, 355-360.

22. Brown, I. M., B. J. Lovett, P.S. Grewal and R. Gaugler. 2002. Latent infection: a low temperature survival strategy in Steinernematid nematodes. Journal of Thermal Biology 27:231-239.
23. Burnell . A. M. R.U. Ehlers and J. P.Masson (eds) .1994 .Genetice of entomopathogenic nematode – bacterium complexs . Report . EUR 15681 EN European commission. Directorate – General XII. Scienc. Research and Development Environmental Research Programme .L-2920
24. Burnell,A.M.,and P.S.Stock. 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts-lethal pathogens of insects. Nematology, 2:31-42
25. Byers, J.A. and G.O. Poinar Jr.1981. Location of insect hosts by the nematode *Newoaplectana carpocapsae* , in response to temperature. Behavior 79: 1-10.
26. Canhilal, R ; Reid, W; Kutuk, H. M; EL-Bouhssini. 2006. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Syria soils. Res. J. Agric. And Biol. Sci. 2(6) : 493-497.
27. Chen Z. X.. S. Y. Chen and D.W. Dixon (eds) . 2004. Nematology. Advances and Perspective. vol. 2, Nematode Management and Utilization CABI publishing . Walling .UK
28. Converse, V. and R. Miller. 1999. Development of the one-on-one quality assay for entomopathogenic nematodes. J. Invertebr. Pathol. 74:143-148.
29. Curran, J. 1993. Post – application biology of entomopathogenic nematodes in soil. In : Bedding, R., Akhurst, A.,Kaya, H.(Eds), Nematodes and the Biological control of insect pests. CSIRO, Melbourne, Australia, pp 67-77.
30. Curto, G., A. Riggiani., S. Verganani., S. Caruso., and E. Ladurner. 2008 : Effectiveness of Entomopathogenic nematodes in the control of *Cydia pomonella* larvae in Northern ItalY IOBC / Wprs Bulletin working Group vol .30(1):271-276.
31. Deseo, K.V. and Docci .1985. Micro biological control against *Zeuzyra pyrina* L. (Lepidoptera : cossidae)Defesa dell piante 8:285-291.
32. Deseo, K. and Miller, L. 1985. Efficacy of entomogenous nematodes, *Steinerma* spp.,against clearwing moth, Synanthedon spp., in northern Italy apple orchards. Nematologica, 31: 100-108.
33. Downes, M. J. and C. T. Griffin .1996. Dispersal behavior and transmission strategies of the entomopathogenic nematodes of *Heterohabditis* and *Steinernema*. Biocontrol Science and Technology, 6, 447- 356.

34. Downes, M. J. And C. T. Griffin. 1991. Recovery of Heterohabditid nematodes for Irish and Scottish solis. In "proceedings of the third European meeting microbial control of pests" IOCP/WPRS Bulletin (P. H. Smits, ED.) , pp. 216-218. Wageningen, the Netherlands.
35. Dunphy, G. B. and G. S. Thurston. 1990. Insect Immunty. In: Gaugler, R. and Kaya, H. K. (eds), Entomopathogenic Nematodes In Biological Control. CRC Press. Boca Raton, Florida. pp.301-323.
36. Dutky, S. R. Thompson, J. V. and cantwell, G. E . 1964 . A technique for the mass propagation of the DD – 136 nematode. J. Insect pathol. 6, 417 – 422.
37. Dutky, S. R., and Hough, W. S. 1955. Note on parasitic nematode from codling moth larvae, *Carpocapsa pomonella*. Proc. Entomol.Soc. Wash. 57, 244.
38. Ehlers, L.E. 1990. Soma contemporary issues in biological control of insects and their relevance to the use of entomopathogenic nematodes. In : Gaugler R and Kaya HK. eds. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press. Boca Raton , FL ; Pp. 1-19.
39. Ehlers, R. U. K. V. Deseo, and E. Stackebrandet. 1991. Identification of *Steinemema* spp. (Nematoda) and symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. From Italian and German soils. Nematologica 37 . 360-366.
40. EI-Sadawy, H. A. And M. M. Shamseldean. 2001. A preliminary investigation on using entomopathogenic nematodes for the control of the flesh fly *Parasarcophaga surcoufi* pupae in the soil. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 11(1/2): 77-83.
41. Forst , S., B. Dowds, N. Boemare, and E. Stackebrandt . 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. Bugs that kill bugs. Annual Review Microbiology , 51 : 47-72.
42. Garcia, L, C. G. R. Carlos, and E. L. G. Leite. 2008. Aplication technology for the Entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* and *Steinernema* sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) to control *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera : Noctuidae) in corn. Neotropical Entomology, 37 (3): 305-311.
43. Garcia Del Pino, F. and A. Palomo. 1996. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida : Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Spanish soils. J. Invertebr. Pathol 68(1):84-90.
44. Gardner, S. L., Stock, S.P. and Kaya, H.K. 1994 . Anew species of *Heterorhabditis* from Hawaian islands Journal of Parasitology 80,100-106.

45. Gatwick, J. 1992. Crop pests in the UK. p. 126–127. In "Collected Edition of MAFF Leaflets". Chapman & Hall, London.
46. Gaugler, R (ed). 2002. entomopathogenic nematology. CABI publishing. Walling. UK .
47. Gaugler, R., Grewal, P., Kaya, H.K. and Smith – Fiola, D. 2000. Quality assessment of commercially produced entomopathogenic nematodes, Biological Control 17,100-109.
48. Gaugler, R., Glazer,I., Campbell, J. F. and Liran, N. 1994. Laboratory and field evaluation of an entomopathogenic nematode genetically selected for improved host – finding, journal of invertebrate pathology 63, 68-73.
49. Gaugler, R; Lewis, E and Stuart, R.J. 1997. Ecology in the service of biological control : the case of entomopathogenic nematodes. Oecologia 109:483-489.
50. Gaugler, R. 1988. Ecological considerations in the biological control of soil-Inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. Agric. Ecosys. Environ. 24:351-360.
51. Gaugler, R. and G. M. Boush. 1978. Effects of ultraviolet radiation and sunlight on the entomogenous nematodes, *Neoaplectana carpocapsae*. Journal of Invertebrate Pathology, 32: 291-296.
52. Georgis, P. O. and G. O. Poinar. 1989. Field effectiveness of entomophilic nematodes, *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. In : A. R. Lesile, and R. L. Metcalf. Eds. Pp. 213-224. Integrated past management for turf grass and ornamentals. US Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 337.
53. Georgis, R. 1990. Formulation and application technology. In : Gaugler, R. and Kaya, H. K. (eds) , Entomopathogenic Nematodes In Biological control. CRC Press. Boca Raton, Florida. Pp. 173-191.
54. Ghally, S. E. 1995. Some factors affecting the activity and pathogenicity of *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema carpocapsae* nematodes. J. Egypt. Soc. Parasitol. 25:125-135.
55. Glazer, I., E. Kozodoi., G. Hashmi and R. Gaugler. 1996. Biological characteristics of the entomopathogenic nematode *Heterohabditis* sp. IS-5: Aheat tolerant isolate from Israel. Nematologica, 24, 481-492.
56. Glazer, I. 2002. Survival biology - In: Gaugler, R. (Hrsg.): "Entomopathogenic nematology." CABI Publishing, Oxon, UK, 169-187.
57. Grant, J.A.,Villani, M. G. 2003. Soil moisture effects on entomopathogenic nematodes . Environ, Entomol. 32: 80-87.

58. Gray, B. D., and J. M. Webster. 1986. Temperature effect on the growth and virulence of *Steinernema feltiae* strains and *Heterorhabditis heliothidis*. Journal of Nemaotology 18(2): 270-272.
59. Grewal . P. S. 2002 . Formulation and application technology . Pp 265-287 in R. Gaugler . (ed). Entomobatogenic nematology. CABI publishing Walling . UK .
60. Grewal, P. S., E.E. Lewis, R. Gaugler, and J. F. Campbell. 1994a. Host finding behavior as apredictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. Parasitology 108,207-215.
61. Grewal, P. S., R.-U Ehlers and D. I. Shapiro- Ilan. 2005. Nematodes as biocontrol agents. CABI Publishing. CAB International Wallingford, Oxfordshire, OX10 8DE, UK. 505pp.
62. Grewal, P. S., S. Selvan and R. Gaugler. 1994b. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes : niche breadth for infection, establishment, and reproducation. J. therm. Biol. 19, 245-253.
63. Grewal, P.S., Gaugler, R., Kaya, H.K. and Wusaty, M. 1993a. infectivity of the entomopathogenic nematode *Steinernema scapterisci* (Nematode : Steinernematidae). J. Invertebr. Pathol.62, 22-28.
64. Grewal,P. S., Kevin, T. Power and Michael klein.2002.*Heterorhabditis zealandica* : anew tool in the management of white grubs in turfgrass and ornamentals. This presentation is part of: Arthropod pests of turfgrass 0177
65. Grewal, P.S., S. Selvan, E. E. Lewis and R. Gaugler. 1993b. Male insect-parasitic nematodes : a colonizing sex. Experientia 49, 605-608.
66. Griffin, C.T . 1993. Temperature responses of entomopathogenic nematodes: implications for the success of biological control programmes. In : Bedding R, Akhurst R and Kaya HK. eds. Nematodes and the Biological Control of Insects. CSRIO Publications. East Melbourne , Australia: Pp . 115-126.
67. Griffin, C.T. and M.J. Downes. 1991. Low temperature activity in *Heterorhabditis* sp. (Nematoda : Heterorhabdidae). Nematologica 37, 83-91.
68. Hara, A. H., J. E. Linde gren , and H. k. kaya. 1981. Monoxenic mass production of the entomo genous nematode , *Neoaplectana carpocapsa* Weisr , on fog food / agar medium. USDS/SEA, AAT –W-16,Oakland, CA.
69. Haukeland, S. 1993. Entomopathogenic nematodes found in Norway. Norwegian, J. Agri. Sci. 7, 17-27.

70. Hazir, S. H. K. Kaya, S. P. Stock, and N. Keskin. 2003. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. Turk. J. Biol. 27:181-202.
71. Hominick. W.M. 2002. Biogeography. Pp 115-143 in: R. Gaugler. (ed). Entomobatogenic nematology.CABI Publishing. Walling. UK.
72. Hominick, W. M., A. P. Reid and B. R. Briscoe. 1995. Prevalenca and habitat specificity of Steinernematid and heterohabditid nematodes isolated during soil surveys of the UK and the Netherlands. Journal of Helminthology 69, 27-32.
73. Hominick, W. M; Briscoe, B. R. 1990. occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida : Steinernematidae and Heterorhabditidae) in British soils Parasitology100:295-302.
74. Iraki, N.N., M. A. Salah., D. Sansour., I. Segal., S. A. Glaser., M. A. Johnick., M. A. Hussein and R. U. Ehlers. 2000. Isolation and characterization of two entomopathogenic nematode strains, *Heterorhabditis indica* (Nematoda : Rhabditida), from the West Bank, Palestinian Territories. J. Appl. Ent. Vol. 124:375-380.
75. Ishibashi, N. And E. Kondo. 1987. Dynamics of the entomogenous nematodes *Steinernema feltiae* applied to soil with and without nematicide treatment. J. of *Nematology*, 19(4)404-412.
76. Jaworaska, M. 1992. Effect of the soil texture and temperature on the activity of *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora* in the soil. Entomonematologica. 1(5), 31-37.
77. Kaya, H. K. 1977. Development of the DD-136 strain of *Neoaplectana carpocapsae* at constant temperatures. J. of Nematology 9(4) 346-349.
78. Kaya, H. K. 1990. Soil ecology. In: Gaugler, R. and Kaya, H. K. (eds) Entomopathogenic Nematodes In Biological Control. CRC Press. Boca Raton, Florida. pp.93-115.
79. Kaya. H.K. and A.M. Koppenhofer. 2004. Biological control of insect and other invertebrates with nematodes. Pp.1083-1132 in: Z. X. Chen , S. Y. Chen and D. W. Dixon (eds). Nematology: Adances and Perspective. Vol. 2, nematode Management and Utilization. CABI Publishing. Walling., UK.
80. Koppenhofer, A.M., E. M. Fuzy .2008. Attraction of four entomopathogenic nematodes to four white grub species journal of invertebrate pathology 99, 227-234.

81. Koppenhofer , A.M. and H.K. Kaya. 1997. Additive and synergistic interaction between entomopathogenic nematodes and Bacillus thurigniensis for scarab grub control. Biological control 8:131-137.
82. Koppenhofer, A. M., E. M. Fuzy. 2009. Long-Term effects and persistence of *steinernema scarabae* : applied for suppression of *Anomala orientalis* (coleoptera : Scarabaeidae) Biological control 48:63-72.
83. Kung, S. P.; Gaugler, R. and Kaya, H. K. 1991. Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. J. Invertebr. Pathol. 57,242-249.
84. Kung, S., R. Gaugler and H. Kaya.1990. Soil type and entomopathogenic nematodes persistence. J. Invertebr. Pathol. 55(3): 401-406.
85. Lacey, L. A., and Unruh, T. R. 1998. Entomopathogenic nematodes for the control of codling moth : Effect of nematode species, dos-age temperature, and humidity under laboratory and simulated field Conditions. Biological control 13: 190-197.
86. Lacey, L.A., Neven, L. G., Headrick, H. L., and R., Jr. 2005. Factors affecting entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) for the conrol of overwintering codling moth (Lepidoptera : Tortricidae) in fruit bins Journal of Economic Entomology 98:1863-1869.
87. Lacey, L.A and Kaya, H.K.2000. Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Kluwer . Dordrecht, the Netherlands.
88. Lacey, L. A., S. P. Arthurs., T. R. Unruh., H. Headrick., R. Jr. Fritts. .2006. Entomopathogenicnematode for control of codling moth (Lepidoptera : Tortricidae) in appleand pear orchards: effect of nematode species and Seasonal temperatures, adjuvants, application equipment and post-application irrigation. Biological control 37:214-223.
89. Lewis. E.E. P.S. Grewal and S. sardanell. 2001. Interactions between the *Steinerneama feltiae –Xanorhabdus bovieni* insect pathogen complex and the root- knot nematode Meloidogyne incognita. Biological control 21:55-65.
90. Lewis, E. E., M. Ricci and R. Gaugler. 1996. Host recognition behavior reflects host suitability for the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* . Parasitology 113:573-579.
91. Liu, J. and R. E. Berry. 1996. *Heterohabditis marelatus* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabdidae) from Oregon. J. Invert. Pathol., 67, 48-54.
92. Mahmoud, M. F., and M. A. M. Osman. 2007. Use of the nematode *Steinernema feltiae* cross N33 as a biological control agent against the

Peach Fly *Bacterocera zanata*. Tunisian Journal of Plant Protection, 2:109-115.

93. Milstead, J. E. 1981. Influence of temperature and dosage on mortality of seventh instar larvae of *Galleria mellonela* (Insecta : Lepidoptera) caused by Heterohabditis bacteriophora (Nematode : Rhabditoidea) and it's bacterial associate *Xenorhabdus Iuminescens*. Nematologica 27, 303-306.
94. Molyneux, A. S. 1985. Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp. (Nematoda : Rhabditida) at various temperatures and their subsequent infectivity for insects. *Rev. Nematol*. 8, 165-170.
95. Mracek, Z. and G. Jenser.1988. First report on entomogenous nematodes of the families Steinernematidae and Heterorhabditidae from Hungary . Acta phytopathologica et Entomologica Hungaricae 23: 153-156.
96. Nguyen. K. B. and G. C. Smart. Jr. 2004. Taxonomy of insect parasitic nematodes Pp.795-878 in Z. X. Chen S. Y. Chen and D.W. Dixon. (eds). Nematology. Advances and perspective. vol. 2 Nematode Management and Utilization . CABI Publishing. Walling. UK.
97. Nguyen B.K. 2008. Morphology and taxonomy of entomopathogenic nematodes: A website Constructed and maintained through Entomology and Nematology Department, University of Florida, Gainesville, USA.
98. Nguyen, K. B; Hunt DJ. 2007. Entomopathogenic Nematodes :Systamation, phlogeny and Bacterial symbionts. University of Florida Publication . Ent and Nem Dep. 816 pp.
99. Nguyen, K. B; Smart, G. C. JR. 1996. Identification of entomopathogenic nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda : Rhabditida). J. Nematol. 28:286-300.
100. Nickle, W. R. 1984 . History, development, and importance of insect nematology .627-653 in W. R. Nickle, ed. plant and insect nematodes. New York : Macel Dekker.
101. Ozar, N; Keskin, N; Kirbas, Z. 1995. Occurrence of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Turkey. Nematology 41:639-640.
102. Pasqualini, E. and Natale, D. 1999. *Zeuzera pyrina* and *Cossus cossus* (Lepidoptera, Cossidae) control by pheromones: four years advances in Italy. IOBC wprs Bulletin 22 (9): 115 – 124.
103. Poinar. G. O. Jr. 1979 . Nematodes for the Biological control of Insects. Boca Raton. FI: CRC Press.

104. Poinar, G. O., Jr. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler, R. and Kaya, H. K. (eds), Entomopathogenic Nematodes In Biological Control. CRC Press. Boca Raton, Florida. Pp. 32-61.

105. Poinar, Jr. G. O. G. K. Karunakar and H. David. 1992. *Heterorhabditis indicus* n. sp. (Rhabditida : Nematoda) from India : separation of *Heterorhabditis* spp. by infective juveniles. fundam appl. Nematol. 15 (5) 467-472.

106. Portillo-Aguilar, C., M. G. Villani, M. J. Tauber, C. A. Tauber and J. P. Nyrop. 1999. Eentomopathogenic nematode (Rhabditida : Heterorhabditidae and Steinernematidae) response to soil texture and bulk density. Environ. Entomol. 28:1021-1035.

107. Quin, X., Kao, R., Yang, H., and Zhang, G. 1988. Study on application of entomopathogenic nematodes of Steinernema bibionis and S.feltiae to control *Anoplophora glabripennis* and *Zeuzera pyrina*. Forest Res. 1:179.

108. Riga, E., L. A. Lacey., N. Guerra, and H. L. Headrick. 2006. Control of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta*, using entomopathogenic nematodes in laboratory and fruit bin assays Journal of Nematology 38(1): 168-171.

109. Saleh, M. M. E. and M. S. T. Abbas. 1998. Suitability of certain entomopathogenic nematodes for controlling *Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera; Cossidae) in Egypt. International. Journal of Nematology, 8(2): 126-130.

110. Selcuk, H; Kaya, H. K; Stock, S. P; Keskin, N. 2003. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological control of soil pests. Turk. J. Biol. 27: 181-202.

111. Shamseldean, M. M. and M. M. Abd – Elgawad. 1994. Natural occurrence of insect pathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae) in Egyptian soils. Afro – Asian Journal of Nematology, 4 (2) 151- 154.

112. Shamseldean, M. M. 1994. Effects of temperature on survival and infectivity of Egyptian Heterorhabditid nematode isolates. Egypt. J. Appl. Sci, 9 (9), 53-59.

113. Shamseldean, M. M., A. B. Abou El-Sooud, M. M. Abd- Elgawad and M. E. Saleh. 1996. Identification of a new heterorhabditid species from Egypt, *Heterorhabditis taysearae*, n.sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae). Egyption J. Biol. Pest Control 6:15-24.

114. Shamseldean, M. M., M. M. Abd- Elgawad and A. A. Atwa. 1996. Evaluation of four entomopathogenic nematodes against *Spodoptera littoralis* (Lepid., Noctuidae) larvae under different temperatures. Anzeiger fur Schadlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz, 69(5): 111-113.
115. Shapiro-Ilan , D., T. E. Cottrell., R. F. Mizell., D. L . Hortan and J .Davis. 2009 . Anovel approach to biological control with entomopatho genic nematodes : prophylactic control of the peach tree borer , *Synanthedon exitiosa* . Biological control (48: 259-263).
116. Steiner, W. A. 1996. Dispersal and Host – Finding apility Of Entomopathogenic nematodes at low temperatures. Nematologica, 42, 243-261.
117. Stock, S. P. and H. K. kaya. 1996. A multivariate analysis of morphometric characters of *Heterorhabditis* species (Nemata : Heterorhbbditidae) and the role of morphometrics in the taxonomy of species of the genus. J. Parasitol., 82 (5), p . 806-813.
118. Stock, S. P. 1995. Natural population of entomopathogenic nematodes in the Pampean region of Argentina. Nematropica 25(2):143-148.
119. Stock, S. P., L. AI- Banna, R. Darwish and A. Katbeh. 2008. Diversity and distribuation of entomopathogenic nematodes (Nematode: Steinernematidae and Heterorhabditidae) and their bacterial symbionts (Y-. Proteobacteria : Enterobacteriaceae) in Jordan. Journal of Invertebrate Pathology 98(2) :228-234.
120. Stuart, R. J., and R. Gugler. 1994. Patchiness in population of Entomopathogenic nematodes . . J.of Invert. Pathol. 64, 39-45.
121. Stuart, R. J., M. E. Barbercheck, P. S. Grewal, R. A. J. Taylor and C. W. Hoy. 2006. Population biology of entomopathogenic nematodes: Concepts, issues, and models. Biological Control 38:80-102.
122. Susurluk, A., I. Dix., E. Stackebrandt, O. Strauch and Wyss. 2001. Identification and ecological characterization of three entomopathogenic nematode-bacterium complexes from Turkey. Nemaotology 3:833-841.
123. Tanada, Y. and Kaya , H.K . 1993. Insect Pathology . Academic Press . San Diego, CA.
124. Thurston, G. S., N. Yansong , and H. K. Kaya. 1994. Influence of salinity on survival and infectivity of entomogenous nematodes. J. of Nematology, 26(3) 345-351.

125. Torrel, A., Barrios, G., Maeso, J., Sabate, P., Riera, M., Villarngap. 1983. Assaig d'insecticides per alcontrol de la *Zeuzera pyrina* en avellaner. del Servei de Protecció deis Vegetáis 44, 1983, 180-185.
126. Ünlü, I. O. and N. Ozer. 2003.Evaluation of the reproducation potential and competition between two entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* Filipjev, 1934 (Rhabditida : Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora*, Poinar 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae). Turk. J. Biol. 27: 149-155.
127. Unruh, T.R., Lacey, L.A. 2001. Control of codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae), with *Steinernema carpocapsae*: effects of supplemental wetting and pupation site on infection rate. Biological Control 20,48–56.
128. Wallace, H.R. 1958. Movement of eclworms. Ann.Appl. Biol., 46: 74-85.
129. Weiser, j.1955. *Neoaplectana carpocapsae* n.sp (Anguillulata, Steinernematidae) novy cizopasnic housenik obalece jablecneho, *carpocapsa pomonella* L. Vestnik Cesk. Zool . spolecnosti 19: 44-52.
130. White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from culture. Scirnce 66:302-303.
131. Womersley, C. Z. 1990. Dehydration survival and anhydrobiotic potential, in Entomopathogenic nematodes in biological (Gaugler, R. and H. K. Kaya. Eds) CRC press, Boca Raton, FL, pp. 117-137.
132. Womersley, C. Z. 1993. Factors affecting physiological fitness and modes of survival employed by dauer juveniles and their relationship to pathogenicity. Nematodes and the biological control of insect pests. R. Bedding, R. Akhurst and H. Kaya. East Melbourne, CSIRO: 79-88.
133. Woodring, J. L. And H. K. Kaya. 1988. Steinemematid and Heterorhabditid Nematodes: A Handbook of Biology and Techniques. Arkansas Agricultural Experiment Station. Southern Cooperative Series, Bulletin 331.
134. Wright, P. J. 1992. Cool temperature reproduction of steinernematid and heterorhabditid nematode. J. Invertebr. Pathol. 60, 148-151.